

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**Diseño de una técnica de amplificación isotérmica mediada por
horquillas (LAMP) *in-house* para la detección de *Plasmodium
falciparum* y *Plasmodium vivax***

PRESENTADA POR:

Br. ANA LUCIA ROSALES ROSAS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

BIÓLOGO

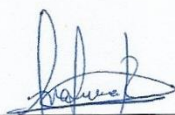
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: BIOLOGÍA MOLECULAR

PIURA - PERÚ

2018

“Diseño de una técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) *in-house* para la detección de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*”

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
BIOLOGÍA MOLECULAR**



Br. Ana Lucia Rosales Rosas
EJECUTOR DE TESIS



Mchlgo. Jaime Fernández Ponce M.Sc

ASESOR



Blgo. Oscar Patricio Nolasco Cárdenas M.Sc.

CO-ASESOR

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS

Yo: **Ana Lucia ROSALES ROSAS**, identificado con DNI N° **70417588**, Bachiller de Escuela Profesional de **CIENCIAS BIOLÓGICAS**, de la Facultad de **CIENCIAS** y domiciliado en **CALLE AREQUIPA 205** del Distrito **PIURA**, Provincia **PIURA**, Departamento **PIURA**. Celular: **988418658**. Email: **analuciarosalesrosas@outlook.com**.

DECLARO BAJO JURAMENTO: que la tesis que presento es original e inédita, no siendo copia parcial ni total de una tesis desarrollada, y/o realizada en el Perú o en el Extranjero, en caso contrario de resultar falsa la información que proporciono, me sujeto a los alcances de lo establecido en el Art. N° 411, del código Penal concordante con el Art. 32° de la Ley N° 27444, y Ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fe de lo cual firmo la presente.

Piura, 23 de Agosto del 2018



Ana Lucia Rosales Rosas
DNI N° 70417588

Art. 411.- El que, en un proceso administrativo, hace una falsa declaración en relación con hechos o circunstancias que le corresponde probar, violando la presunción de veracidad establecida por ley, será reprimido con pena privativa de libertad no menor de uno ni mayor de cuatro años.

Art. 4 Inciso 4.12 del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales – RENATI Resolución de Consejo Directivo N°033-2016-SUNEDU/CD.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

“Diseño de una técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) *in-house* para la detección de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*”

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

BIOLOGÍA MOLECULAR



Mcblgo. Cesar Torres Díaz. M.Sc.
PRESIDENTE DEL JURADO



Mcblgo. Jorge Bermejo Benites
SECRETARIO DEL JURADO



Dr. Carlos Enrique Holguín Mauricci
VOCAL DEL JURADO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE CIENCIAS



ACTA DE SUSTENTACIÓN 050-2018-D-FC-UNP

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada **“DISEÑO DE UNA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR HORQUILLAS (LAMP) IN-HOUSE PARA LA DETECCIÓN DE *Plasmodium Falciparum* Y *Plasmodium vivax*”** presentada por la señorita Bachiller **ANA LUCÍA ROSALES ROSAS**, con el asesoramiento del **Mchlgo. Jaime Napoleón Fernández Ponce, M.Sc** y **Co-Asesor Blgo. Oscar Patricio Nolasco Cárdenas, M.Sc.**; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, la declaran:

APROBADA (X)

DESAPROBADA ()

Con la mención de:

Excoelente

☒ En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**.

☒ En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**; después que el sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 23 de agosto 2018.


Blgo. CÉSAR AUGUSTO TORRES DÍAZ, M.Sc.
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS


Mchlgo. JORGE BERMEJO BENITES
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS

Dr. CARLOS ENRIQUE HOLGUÍN MAURICCI
VOCAL DE JURADO DE TESIS



Campus Universitario - Urb. Miraflores S/N. Castilla
PIURA – PERU

Dedicatoria

*A mis padres, Hugo y Carmen;
A mis hermanos, Fiorella y Hugo;
A mis tías, Sonia, Martina y Juana.
Por alentarme a perseguir mis sueños,
por su incondicional apoyo e infinito amor
en cada etapa de mi vida.*

Agradecimientos

A CIENCIACTIVA, ente financiador del presente estudio de investigación dentro del Proyecto “Círculo de Investigación para la implementación de una plataforma de diagnóstico molecular diferencial y TICs para la vigilancia de Zika, Dengue, Chikungunya y Malaria”. Convenio FONDECYT 162-2016.

Al apoyo de la Cooperación Belga, *Framework Agreement 4* (ITM - FA4) del proyecto "*STRENGTHEN R & D CAPACITY FOR IMPROVING STRATEGIES AND / OR METHODS FOR DIAGNOSIS, MONITORING AND CONTROL OF INFECTIOUS DISEASES*".

A Dionicia Gamboa, coordinadora general del Laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por permitirme formar parte de este.

A Oscar Nolasco Cárdenas, director del Círculo de Investigación y Co-Asesor, por todo lo aprendido, por confiar en mí y darme la oportunidad de llevar a cabo mi tesis de licenciatura bajo su tutela.

A Jaime Fernández Ponce, profesor y Asesor, por haberme brindado su tiempo, apoyo y consejo en el desarrollo del presente trabajo.

A Scarlett Barrientos Peña y Melissa Miranda Lucero, las mejores compañeras, por el apoyo y las experiencias compartidas en el corto pero valioso momento que coincidimos en el Laboratorio de Malaria.

Tabla de contenido

Introducción

1.	Aspectos de la problemática.....	16
1.1.	Generalidades de malaria	16
1.1.1.	Etiología	16
1.1.2.	Ciclo de vida de <i>Plasmodium spp.</i>	16
1.1.3.	Sintomatología	18
1.1.4.	Diagnóstico.....	19
1.1.4.1	Microscopía.....	19
1.1.4.2	Pruebas de Diagnóstico Rápido.....	20
1.1.4.3	Pruebas Moleculares.....	20
1.2.	Situación de malaria a nivel global	21
1.2.1.	Control y eliminación de malaria	21
1.2.2.	La malaria en el Perú.....	22
1.3.	Justificación e Importancia de la Investigación	25
1.4.	Objetivos	28
1.5.	Delimitación de la investigación	28
2.	Marco Teórico.....	30
2.1.	Amplificación Isotérmica mediada por Horquillas (LAMP).....	30
2.2.	<i>Targets</i> multicopia de amplificación.....	31
2.3.	Valores analíticos de una prueba diagnóstica.....	32
2.4.	Hipótesis.....	32
3.	Marco Metodológico	33
3.1.	Diseño de Estudio.....	33
3.2.	Métodos y Procedimientos	34
3.2.1.	Análisis bioinformático <i>in-silico</i>	34
3.2.1.1	Selección de <i>targets</i> de amplificación.....	34
3.2.1.2	Análisis de secuencias.....	34
3.2.1.3	Diseño de cebadores para LAMP.....	34
3.2.1.4	Análisis de estructuras secundarias y especificidad.....	36
3.2.1.5	Ubicación de los cebadores en las secuencias de <i>Pfr364</i> y <i>Pvr47</i>	36
3.2.2.	Estandarización de las condiciones de amplificación	37
3.2.3.	Análisis de especificidad y sensibilidad analíticas.....	39
3.2.3.1	ADN plasmídico como control positivo.....	39
3.2.3.2	Especificidad analítica de los cebadores de LAMP.....	43

3.2.3.3	Sensibilidad analítica de los cebadores de LAMP.....	44
3.2.4.	Evaluación de un grupo de muestras.....	44
3.3.	Aspectos éticos.....	45
4.	Resultados	46
4.1.	Análisis bioinformático <i>in-silico</i>	46
4.2	Estandarización de las condiciones de amplificación.....	49
4.3	Especificidad analítica de los cebadores de LAMP.....	49
4.4	Sensibilidad analítica de los cebadores de LAMP.....	50
4.5	Evaluación de un grupo de muestras.....	50
5.	Discusión.....	52
6.	Conclusiones	56
7.	Referencias Bibliográficas	57

Índice de tablas

Tabla 1. Características de los paroxismos maláricos según la especie de <i>Plasmodium</i> infectante.....	18
Tabla 2. Reacción de ligación del producto de amplificación con el vector.....	40
Tabla 3. Diluciones seriadas 1:10 de ADN plasmídico conteniendo el <i>target</i> de <i>P. falciparum</i> ...	43
Tabla 4. Diluciones seriadas 1:10 de ADN plasmídico conteniendo el <i>target</i> de <i>P. vivax</i>	43
Tabla 5. Secuencias de los cebadores LAMP correspondientes a <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i>	46
Tabla 6. Características de los cebadores diseñados para el <i>target</i> <i>Pfr364</i> (<i>Plasmodium falciparum</i>).....	47
Tabla 7. Características de los cebadores diseñados para el <i>target</i> <i>Pvr47</i> (<i>Plasmodium vivax</i>)...	48
Tabla 8. Resultados de los ensayos de especificidad de los cebadores de <i>Pfr364</i> y <i>Pvr47</i> evaluados contra otras especies de malaria.....	50
Tabla 9. Rendimiento de LAMP <i>Pfr364</i> , <i>Pvr47</i> y microscopía, en comparación con el estándar de referencia qPCR.....	51

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de Plasmodium en el vector (mosquito) y el hospedero humano.....	17
Figura 2. Fases del programa de malaria e hitos en el camino hacia la eliminación de la malaria.....	22
Figura 3. Casos anuales estimados de malaria en total y por especies, cuando están disponibles.....	23
Figura 4. Tendencias históricas de incidencia de malaria reportada en Perú: 1940-2015.....	25
Figura 5. Cuadro resumen del Programa Malaria Cero, señalando las características y objetivos de cada fase etapa que comprende.....	27
Figura 6. La posición de diferentes enfoques/pruebas de diagnóstico en relación con la morbilidad, la prevalencia del parásito, las densidades y las diferentes etapas hacia la eliminación de la malaria.....	27
Figura 7. Ubicación satelital de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Frontis de la UPCH.....	28
Figura 8. Frontis del edificio de Laboratorios de Investigación y Desarrollo “Abraham Vaisberg Wolach” de la Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Telleri”. Grupo del Laboratorio de Malaria en el Campus UPCH.....	29
Figura 9. Diagrama explicativo sobre los cebadores necesarios para la reacción de LAMP.....	30
Figura 10. Diseño de estudio del trabajo de investigación.....	33
Figura 11. Distancias recomendadas (pb) entre los cebadores de la reacción de LAMP.....	35

Índice de anexos

Anexo 1. Alineamiento en MEGA 7 de <i>Pfr364</i> para <i>P. falciparum</i>	62
Anexo 2. Alineamiento en MEGA 7 de <i>Pvr47</i> para <i>P. vivax</i>	62
Anexo 3. Precipitación de productos de PCR.....	63
Anexo 4. Transformación de células químicamente competentes.....	64
Anexo 5. <i>Minipreparation</i> del plásmido.....	65
Anexo 6. <i>Midipreparation</i> del plásmido.....	66
Anexo 7. Determinación teórica del número de copias en una concentración conocida de ADN plasmídico.....	67
Anexo 8. Flujograma de la extracción “ <i>Boil & Spin</i> ”.....	68
Anexo 9. Flujograma de la reacción de LAMP en un formato simplificado.....	69
Anexo 10. Aprobación del Comité de Ética de UPCH.....	70
Anexo 11. Ensayo de especificidad analítica para el sistema LAMP de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i>	71
Anexo 12. Ensayo de sensibilidad analítica para el sistema LAMP de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i>	72
Anexo 13. Resultados de todas las muestras qPCR positivas.....	73

Resumen

Se reportan cebadores de LAMP diseñados específicamente para el gen *Pfr364*, que se encuentra hasta en 41 copias en el genoma de *P. falciparum*; y también cebadores específicos para el gen *Pvr47*, presente en 14 copias en el genoma de *P. vivax*. Se utilizó el software MEGA 7 para alinear las secuencias de cada uno de los *targets* de amplificación extraídas de la base de datos del NCBI y, posteriormente, en el diseño de cebadores de LAMP se empleó *PrimerExplorer* V5. Las secuencias diseñadas fueron evaluadas con *OligoAnalyzer* para predecir la formación de estructuras secundarias y con *PrimerBlast* para ver la especificidad del cebador hacia el *target*. Consecutivamente, con estos cebadores se desarrolló con éxito un sistema LAMP colorimétrico para la detección de infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax* en simultáneo, lo que supuso probar un nuevo método de visualización de resultados alternativo, aprovechando la caída de pH en la reacción de amplificación. Asimismo, utilizando ADN plasmídico se determinó el límite de detección del LAMP *P. falciparum* en 18.68 parásitos/ μ L y para *P. vivax* en 3.89 parásitos/ μ L, con un tiempo de incubación menor a una hora. Los resultados obtenidos sugieren que el sistema LAMP diseñado podría suponer una prueba diagnóstica simple y sensible para la detección de rutina de infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax* asequible y fácil de manejar en entornos donde la ubicación e infraestructura no permite la implementación de métodos moleculares más sofisticados.

Palabras claves: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, LAMP, malaria, *Pfr364*, *Pvr47*, rojo neutro.

Abstract

This study reports LAMP primers designed specifically for the *Pfr364* gene, which is found in up to 41 copies in the genome of *P. falciparum*, also specific primers for the *Pvr47* gene, present in 14 copies in the *P. vivax* genome. MEGA 7 software was used to align the sequences of each amplification target downloaded from NCBI database and PrimerExplorer V5 to design LAMP primers based on these targets. The designed sequences were evaluated with OligoAnalyzer to predict secondary structures formation and PrimerBlast to see primers specificity towards each target. Then, a colorimetric LAMP system for detection of *P. falciparum* and *P. vivax* infections was successfully developed, which involved testing a new alternative method to visualize LAMP results, taking advantage of the pH drop caused by amplification. Likewise, plasmid DNA was used to determine the limit of detection of LAMP *P. falciparum* in 18.68 parasites/ μ L and for *P. vivax* in 3.89 parasites/ μ L, with an incubation time of less than one hour. The results obtained suggest that the designed LAMP system could be a simple and sensitive diagnostic test for the routine detection of *P. falciparum* and *P. vivax* infections. It has shown to be affordable and easy to handle in environments where the location and infrastructure do not allow implementation of more sophisticated molecular methods.

Key words: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, LAMP, malaria, *Pfr364*, *Pvr47*, neutral red.

Introducción

La malaria es una enfermedad que tiene un impacto devastador en la salud pública, reportando en el año 2015 un estimado de 212 millones de casos a nivel mundial y 429 000 muertes (OMS, 2017). Es causada por protozoarios del género *Plasmodium* que se transmiten al ser humano mediante artrópodos vectores infectados del género *Anopheles*. Actualmente se reconocen cinco especies de parásitos causantes de malaria, considerándose a *P. falciparum* como la especie más letal (Ministerio de Salud y Protección Social & Federación Médica Colombiana, 2013).

El diagnóstico de la malaria se realiza por la detección del parásito en sangre en personas infectadas, utilizando frecuentemente la técnica *gold standard* para malaria que es la gota gruesa. Sin embargo, el resultado obtenido mediante este método va a estar influenciado por una serie de factores tales como el entrenamiento del microscopista, la preparación de la lámina o el equipo utilizado, entre otros (Wongsrichanalai, Barcus, Muth, Sutamihardja, & Wernsdorfer, 2007).

Se han desarrollado métodos de amplificación para la detección de *Plasmodium* basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Aunque estos sistemas constituyen un método altamente sensible y específico, los ensayos de PCR no son factibles en entornos de campo por requerir de equipos e infraestructura especializada que difícilmente puede ser implementado en la mayoría de zonas donde la malaria es endémica debido a que son pobres y remotas (Bell & Ranford-Cartwright, 2002; Lau, Lai, Fong, Jelip, & Mahmud, 2016).

En este contexto, la amplificación isotérmica mediada por un bucle (LAMP) es un método molecular rápido y sensible que permite la amplificación del ADN bajo condiciones isotérmicas. Esto supone una alternativa viable para su uso en campo por las facilidades que brinda (Notomi et al., 2000).

No obstante, la mayoría de los ensayos para el diagnóstico por PCR se basan en el gen ribosomal 18S como blanco (18S ARNr) presente en solo 5 – 8 copias por genoma (Haanshuus et al., 2013). En la última década se ha descubierto otra secuencia blanco no ribosomal, con 41 copias en el genoma del parásito, y que ha sido descrita para la identificación de *P. falciparum* (*Pfr364*), y otra secuencia para *P. vivax* (*Pvr47*) con 14 copias en el genoma correspondiente. Estas

secuencias suponen un blanco más sensible para ser usado en el diagnóstico molecular (Demas et al., 2011).

Por otro lado, la característica más atrayente del método LAMP es la capacidad de conocer el resultado a simple vista, utilizando para esto diversos métodos que van desde medir la turbidez del tubo al finalizar la reacción, agregar diferentes reactantes que produzcan fluorescencia al ser observados bajo luz ultravioleta o aprovechar la caída de pH en la reacción de amplificación usando colorantes indicadores de pH (Lucchi, Ljolje, Silva-Flannery, & Udhayakumar, 2016; Tanner, Zhang, & Evans, 2015; Zhou et al., 2014)

Con este trasfondo, el presente trabajo de investigación se centró en la búsqueda, diseño y estandarización de cebadores para su uso en LAMP para detectar, en condiciones de trabajo en el campo, infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax*; así como determinar la sensibilidad y especificidad analítica del sistema obtenido.

1. Aspectos de la problemática

1.1. Generalidades de malaria

1.1.1. Etiología

La malaria, también conocida como paludismo, es una enfermedad infecciosa causada por protozoarios del género *Plasmodium* (*Apicomplexa*: Plasmodiidae) que se transmiten a través de la picadura de vectores hembra infectados del género *Anopheles* (*Arthropoda*: Culicidae). Actualmente se reportan cuatro especies de parásitos causantes de malaria en humanos: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* (Gutierrez & Arróspide, 2003).

Las especies consideradas más importantes son dos: *P. falciparum*, por causar complicaciones severas durante la infección que pueden llevar a la muerte del paciente; y *P. vivax*, menos peligroso, se cree que posee un estado quiescente en el hígado capaz de desencadenar recaídas de la enfermedad en el individuo (Miller, Baruch, Marsh, & Doumbo, 2002); ambas especies se encuentran distribuidas en el Perú.

Ocasionalmente se reportan casos de humanos infectados con parásitos responsables de la malaria en simios, como *P. knowlesi*; sin embargo, la transmisión de dicho parásito entre humanos es todavía hipotética (OMS, 2016).

1.1.2. Ciclo de vida de *Plasmodium spp.*

El ciclo de vida de los parásitos del género *Plasmodium* involucra dos tipos de hospederos: mosquitos hembras de *Anopheles* y humanos. El desarrollo del ciclo en el vector es el sexual, mientras que en el humano se da el ciclo asexual (OMS, 2016).

Cabe resaltar que el proceso de infección en el humano comienza con la picadura del mosquito parasitado y, en consecuencia, la inyección de los esporozoítos en el torrente sanguíneo del hospedero mamífero (Figura 1; 1), los cuales circulan en la sangre hasta llegar al hígado en donde invaden las células hepáticas (Figura 1; 2). Se inicia entonces la fase exoeritrocítica (Figura 1; A), y, en aproximadamente 4 semanas, los esporozoítos maduran a esquizontes tisulares (Figura 1; 3). Con la ruptura de estos últimos se liberan los merozoítos al torrente sanguíneo, dando lugar a la fase eritrocítica (Figura 1; B) del ciclo (Figura 1; 4,5). Los parásitos se adhieren e invaden los eritrocitos, donde se desarrollan al estado de trofozoíto e inician un proceso de maduración que culminará con la formación de un esquizonte eritrocítico y su posterior ruptura, liberando merozoítos que

continuarán con la invasión de eritrocitos y la etapa de reproducción asexual eritrocítica (Figura 1; 6). Durante la fase eritrocítica, algunos trofozoítos se diferencian a la forma sexual del parásito o gametocito masculino (microgametocito) o gametocito femenino (macrogametocito) (Figura 1; 7).

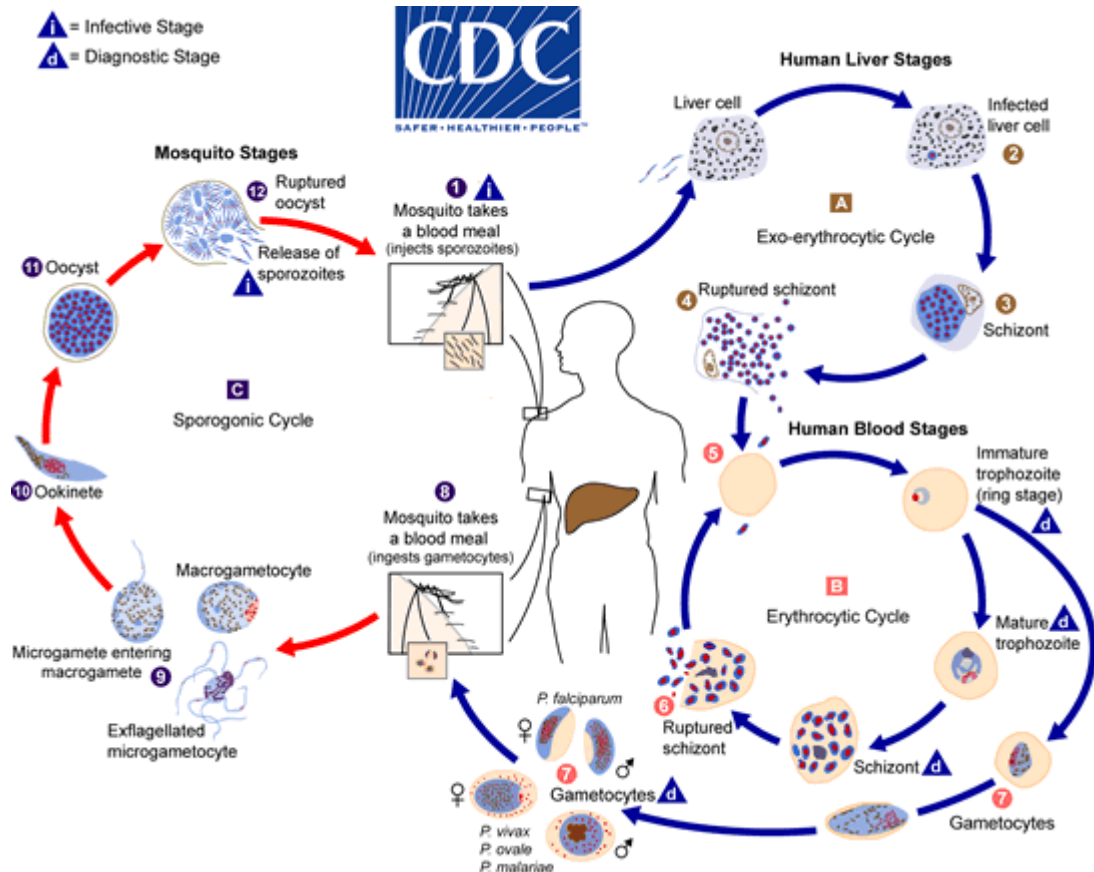


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium* en el vector (mosquito) y el hospedero humano. Tomado de la página web del Center for Disease Control.

El mosquito se infecta del hospedero humano durante la alimentación (Figura 1; 8), los gametocitos circulantes son captados por el vector, migrando hacia el intestino, donde se fusionan para formar cigotos (Figura 1; 9) e iniciar el ciclo sexual o esporogónico (Figura 1; C). El cigoto se desarrolla a ooquistos invasores (Figura 1; 10), los que atraviesan el intestino medio y se transforman en un ooquiste (Figura 1; 11). En aproximadamente 10 a 14 días, a través de divisiones mitóticas, se producen miles de esporozoítos que luego son liberados con la ruptura del quiste (Figura 1; 12) y migran a las glándulas salivales, reiniciando el ciclo al ser el mosquito capaz de infectar al humano (Figura 1; 1).

1.1.3. Sintomatología

Se puede definir un periodo de incubación, comprendido entre la inoculación del parásito por parte del vector y la formación de esquizontes eritrocíticos, cuya ruptura y consecutiva liberación de merozoítos conlleva al inicio de los síntomas de la enfermedad. Este periodo varía con cada especie de *Plasmodium*, entre 8 a 40 días (Campuzano & Blair, 2010).

Los primeros síntomas que se pueden presentar son dolor de cabeza, debilidad, fatiga, dolor en articulaciones y músculos; posteriormente, SE inician los paroxismos clásicos de la malaria, con la aparición abrupta de cuatro etapas sucesivas: escalofríos, fiebre, sudoración intensa (diaforesis) y apirexia (periodos sin fiebre). De igual manera que con los periodos de incubación y otras características, la duración de estas etapas varía con la especie de *Plasmodium* infectante (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2011) (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los paroxismos maláricos según la especie de *Plasmodium* infectante. Modificado de: Campuzano, G., & Blair, S. (2010). Malaria: Consideraciones sobre su diagnóstico, 16(7), 311-354.

Especie de <i>Plasmodium</i>	Periodo de incubación (días)	Periodicidad de paroxismos febriles (horas)	Duración en horas de crisis febril	Etapas del glóbulo rojo parasitado	Hipnozoítos
<i>P. falciparum</i>	8 - 25	48	40	Cualquier edad	-
<i>P. vivax</i>	21 - 32	48	11	Reticulocitos	+
<i>P. ovale</i>	21 - 32	48	11	-	+
<i>P. malariae</i>	Meses	72	9	Senescentes	-

Las manifestaciones clínicas de la malaria son expresión de la carga parasitaria en la sangre y del estado de inmunidad del paciente, siendo el primero promotor y el segundo mitigador de los síntomas o desencadenante de malaria grave (Campuzano & Blair, 2010).

Si hay falla terapéutica o un tratamiento tardío, la carga de parásitos aumenta y puede desencadenarse una malaria complicada progresando en pocas horas a una enfermedad grave presentando anemia severa, acidosis metabólica, hipoglicemia, falla renal aguda y edema agudo de pulmón. De no recibir tratamiento adecuado en esta fase, la malaria severa es fatal (Campuzano & Blair, 2010; Ministerio de Salud y Protección Social & Federación Médica Colombiana, 2013).

1.1.4. Diagnóstico

La microscopía óptica de campo claro, con un examen de gota gruesa o un frotis de sangre del paciente, es el método fundamental y rutinario para establecer el diagnóstico parasitológico de malaria, denominada la técnica *gold standard* en el laboratorio (Ministerio de Salud, 2007; Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2011).

Otros métodos de diagnóstico incluyen los kits de detección del antígeno del parásito o pruebas de diagnóstico rápido (*RDTs*) y técnicas moleculares. Cada uno de estos métodos cuenta con sus ventajas y limitaciones, y con el potencial de ser utilizados en diferentes niveles del sistema de salud (Abdul-Ghani, Al-Mekhlafi, & Panagiotis, 2012).

1.1.4.1. Microscopía

Según la Norma Técnica de Salud para la Atención de la Malaria y Malaria Grave en el Perú, para hacer el examen de gota gruesa, la toma de la muestra se realiza por punción con una lanceta estéril, en la zona lateral de un dedo de la mano izquierda, previamente desinfectado (Ministerio de Salud, 2007).

La primera gota de sangre es descartada, luego se extraen dos gotas, las cuales son depositadas en la superficie de una lámina portaobjeto; con una de ella se prepara la gota gruesa que sirve para detectar la presencia del parásito, y con la otra gota, se prepara el frotis de sangre para la identificación de la especie de *Plasmodium* (Gutierrez & Arróspide, 2003; Ministerio de Salud, 2007).

La determinación de la densidad parasitaria en el paciente se efectuará a través del método de conteo por cruces y/o el cálculo de la cantidad de parásitos por microlitro de sangre (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2011).

En condiciones óptimas, el límite de detección de la gota gruesa ha sido estimado en 4-20 parásitos/ μ L (Dowling & Shute, 1966; Wongsrichanalai et al., 2007). Sin embargo, en condiciones de campo un umbral de 50-100 parásitos/ μ L es más realista debido a las limitaciones prácticas que se presentan. En lugares remotos, con microscopistas menos capacitados y equipos deficientes, el límite de detección probablemente sería aún más alto (Wongsrichanalai et al., 2007). Además, la identificación de especies en infecciones mixtas es difícil de

determinar con microscopía requiriendo de personal altamente capacitado (Abdul-Ghani et al., 2012).

1.1.4.2. Pruebas de diagnóstico rápido (PDRs)

Las pruebas de diagnóstico rápido de la malaria, denominadas también “tiras reactivas” o “dispositivos de diagnóstico rápido de la malaria”, detectan antígenos específicos producidos por los parásitos de la malaria, los cuales están presentes en la sangre de las personas infectadas. Generalmente estas pruebas vienen en un formato de tira reactiva de nitrocelulosa dentro de un cartucho, y que contiene pocillos donde se coloca la sangre y un amortiguador (OMS, 2006).

La principal desventaja de las pruebas de diagnóstico rápido son las limitaciones que presenta en cuanto a sensibilidad y la capacidad de diferenciar especies (Abdul-Ghani et al., 2012). Las pruebas de diagnóstico rápido no son capaces de detectar una densidad parasitaria menor a 100 parásitos/ μ L, especialmente en condiciones donde los individuos asintomáticos tienen una densidad parasitaria aún menor.

1.1.4.3. Pruebas moleculares

Métodos de amplificación basados en la reacción en cadena de la polimerasa tales como PCR múltiple, PCR en tiempo real y recientemente un método de amplificación de ADN mediado por horquillas, han sido desarrollados para la detección de los parásitos de la malaria (Bell & Ranford-Cartwright, 2002; Demas et al., 2011).

En cuanto al límite de detección del PCR, es aproximadamente de 1 parásito/ μ L, dependiendo del tipo de ensayo (Oriero, Jacobs, Van Geertruyden, Nwakanma, & D'Alessandro, 2014), siendo así el método más sensible y específico, además de contar con la capacidad de detectar a pacientes asintomáticos y submicroscópicos.

Por otro lado, aunque las técnicas de diagnóstico molecular constituyen el método más preciso y sensible para la detección de las especies de parásitos de malaria, su uso está restringido a laboratorios de referencia o estudios de investigación (Demas et al., 2011). Los ensayos de PCR son menos factibles de realizar en entornos de campo porque son propensos a la contaminación de la muestra y se requiere de equipo especializado e instalaciones de almacenamiento que no se pueden implementar debido a que la mayoría de zonas donde la malaria es endémica son pobres y

remotas (Lau et al., 2016; Oriero et al., 2014; Poschl, Waneesorn, Thekiso, Chutipongvivate, & Panagiotis, 2010).

La posibilidad de poder amplificar el ADN en condiciones isotérmicas sin la necesidad de un termociclador ha abierto un abanico de oportunidades para realizar el diagnóstico molecular a un nivel más periférico y, por lo tanto, mejorar el manejo de la enfermedad en entornos con recursos limitados (Oriero et al., 2014).

1.2. Situación de malaria a nivel global

La malaria es considerada una enfermedad que causa severos perjuicios en la salud pública a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) a inicios del año 2016, alrededor de 3.2 billones de personas (lo cual es aproximadamente la mitad de la población mundial) se encontraba viviendo en zonas con riesgo de contraer malaria (OMS, 2017).

Se estima que en el año 2016 ocurrieron 216 millones de casos de malaria en el mundo, concentrándose el 90% de casos en el continente africano y, apenas el 0.9% en la región de las Américas. *Plasmodium falciparum* es la especie de parásito más prevalente en África subsahariana, mientras que *P. vivax* predomina en la región de las Américas (OMS, 2017).

En América del Sur, los casos de malaria en el año 2015 se distribuyeron de la siguiente manera: Brasil (24%), Venezuela (30%), Colombia (10%) y Perú (9%), concentrando así el 73% de los casos a nivel mundial en las Américas (Recht et al., 2017).

1.2.1. Control y eliminación de malaria

El objetivo último de los programas de control de malaria es la interrupción de la transmisión local de un parásito específico causante de la enfermedad en una zona geográfica definida (OMS, 2009).

La Organización Mundial de la Salud define cuatro etapas que conforman el Programa de Eliminación de la Malaria: (1) fase de control, (2) fase de pre-eliminación, (3) eliminación y (4) la prevención de la reintroducción de la enfermedad (OMS, 2016).

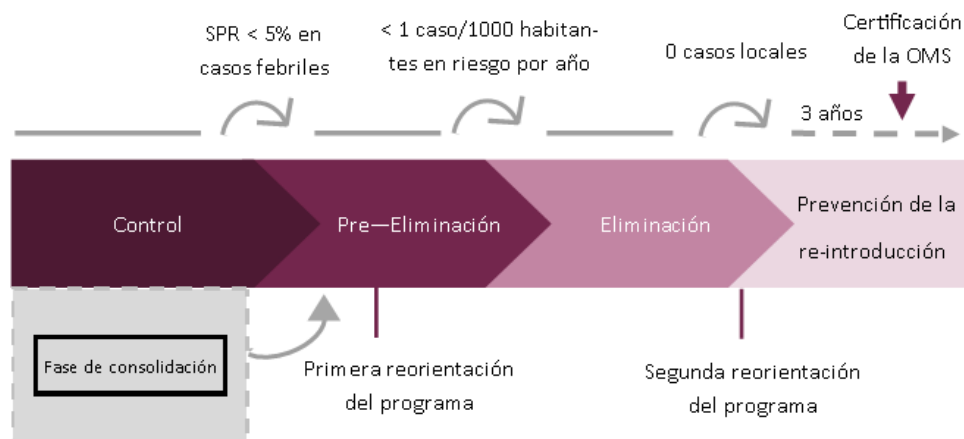


Figura 2. Fases del programa de malaria e hitos en el camino hacia la eliminación de la malaria. SPR: Tasa de positividad de la lámina o prueba de diagnóstico rápida. Modificado de: OMS. (2016). *Training module on Malaria Elimination* (p. 153). Geneva: Organización Mundial de la Salud.

El ritmo con el que un país se acerca a la eliminación de la malaria va a depender de muchos factores, entre ellos, la solidez del sistema nacional de salud, el nivel de inversión, algunos determinantes biológicos, aspectos medioambientales y la realidad social del país en cuestión (OMS, 2009).

1.2.2. La Malaria en el Perú

Junto con los españoles, en el siglo XVI, llegó la malaria al Perú, se expandió por toda la costa y los valles interandinos; extendiéndose gracias a la migración de los pobladores hacia la región amazónica (Griffing, Gamboa, & Udhayakumar, 2013).

Entrando al siglo XX la malaria era un serio problema de salud pública, especialmente en campañas agrícolas, durante las cuales pobladores andinos dejaban sus hogares y descendían a los arrozales; sin embargo, debido a que en su niñez no habían estado expuestos a la enfermedad no poseían ningún grado de inmunidad, enfermaban y causaban severos brotes de la enfermedad cada vez que migraban a la costa (Griffing et al., 2013).

En el año 1916 se da la primera ley nacional de control de malaria, según la cual los dueños de tierras agrícolas debían adoptar ciertas medidas y proveer medicación para prevenir y tratar brotes de malaria. Como resultado de un desordenado manejo de las condiciones que propiciaban la expansión y aumento de número de casos, a fines de la década de 1930 se estimaba unos 300 mil casos de malaria al año en el país (Griffing et al., 2013).

En el último siglo, en el Perú se han realizado numerosos esfuerzos por combatir la creciente ola de casos de la enfermedad con distintos programas y estrategias. En el año 1957, se comenzó con la conformación del Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria resultando en el nivel más bajo de casos con 1500 anuales reportados en 1965, esto debido al uso de DDT en campañas de control del vector en casi todos los valles costeros y algunos de la Amazonía. Para 1970, el vector predominante en la Amazonía estaba a punto de ser eliminado, y casi toda la costa, los valles interandinos y la región sur de la Amazonía parecían llegar a estar libres de la malaria (Rosas-Aguirre et al., 2016).

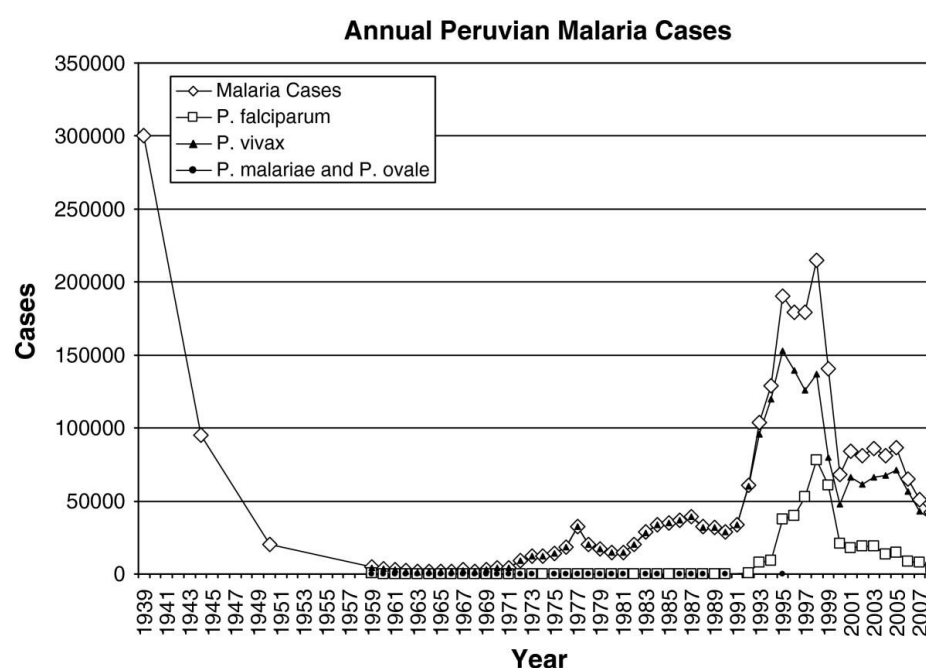


Figura 3. Casos anuales estimados de malaria en total y por especies. Tomado de: Griffing, S. M., Gamboa, D., & Udhayakumar, V. (2013). The history of 20th century malaria control in Peru. *Malaria Journal*, 12(1), 303.

Sin embargo, la malaria empezó a resurgir por una reducción en los fondos destinados al control de la enfermedad; y del desarrollo de resistencia al DDT por parte del vector; en el año 1987, se reportaban cerca de 40 mil casos en el país, la gran mayoría en la Amazonía (Griffing et al., 2013).

A pesar de que, en el Perú, los casos reportados de malaria entre los años 1940 a 1990 no eran diferenciados sistemáticamente por especie, se cree que *P. vivax* era el parásito predominante (Rosas-Aguirre et al., 2016); una tendencia que permanece hasta la actualidad, donde aproximadamente el 80% de infecciones de

malaria son causadas por *P. vivax* y el 20% restante por *P. falciparum* (RENACE, 2018).

Esta proporción se vio alterada temporalmente por la ocurrencia de un Fenómeno de El Niño de moderada intensidad en el año 1997, sumándose a la diseminación del vector *Anopheles darlingi* en la Amazonía y la introducción de cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina y de *P. vivax* resistentes a cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina en la región. La combinación de estas condiciones dio como resultado el escenario idóneo para el aumento descontrolado de casos de malaria, el cual llegó a niveles exorbitantes en el año 1998 reportando 200 mil casos, de los cuales el 60% y 40% correspondían a *P. vivax* y *P. falciparum* respectivamente (Griffing et al., 2013; Rosas-Aguirre et al., 2016, 2015).

En este periodo pandémico de 1997 a 1999, las regiones más afectadas fueron la costa norte y la Amazonía peruana. No obstante, la implementación de terapias combinadas con artemisina como primera línea de tratamiento para *P. falciparum* y variación de la dosis en el tratamiento de infecciones por *P. vivax*, disminuyeron de manera considerable el número de casos. En la costa norte, esta nueva política de tratamiento fue adoptada más rápido en comparación con la región amazónica, principalmente por proporcionar una mejor accesibilidad a las zonas en donde la malaria era endémica, lo que facilitaba el entrenamiento y supervisión del personal de salud y establecimientos. Dichas medidas se vieron reflejadas en la disminución de la incidencia de malaria en la costa norte del Perú hacia el año 2000 (Rosas-Aguirre et al., 2016).

Con respecto a la región amazónica, cuando se logró estabilizar una incidencia anual de 50 mil casos en promedio, entre octubre del año 2005 y septiembre del año 2010, se implementó el proyecto “Control de la Malaria en las Zonas Fronterizas de la Región Andina: Un Enfoque Comunitario” (PAMAFRO); cuyas acciones redujeron los casos de malaria en Loreto en un 80% llegando a ser reportados menos de 12 mil en el año 2011. Desafortunadamente, estas medidas de control fueron descontinuadas por el Ministerio de Salud, razón por la cual, juntamente con otras condiciones climatológicas, la enfermedad resurgió en la zona doblando el número de casos para el año 2012. En el año 2017 se han reportado un total de 55 202 casos de malaria, de los cuales 42 046 (76.2%) son infecciones por *P. vivax* y 13 156 (23.8%) por *P. falciparum*; el 96.2% de los casos se presentaron en el departamento de Loreto (Griffing et al., 2013; RENACE, 2018; Rosas-Aguirre et al., 2016).

Con el objetivo general de desarrollar un programa de eliminación de esta enfermedad en la región amazónica con enfoque comunitario e intercultural, en abril del 2017, se aprobó el documento técnico “Plan Malaria Cero periodo 2017-2021” propuesto por la Dirección General de Intervenciones Estratégicas en Salud Pública (El Peruano, 2017).

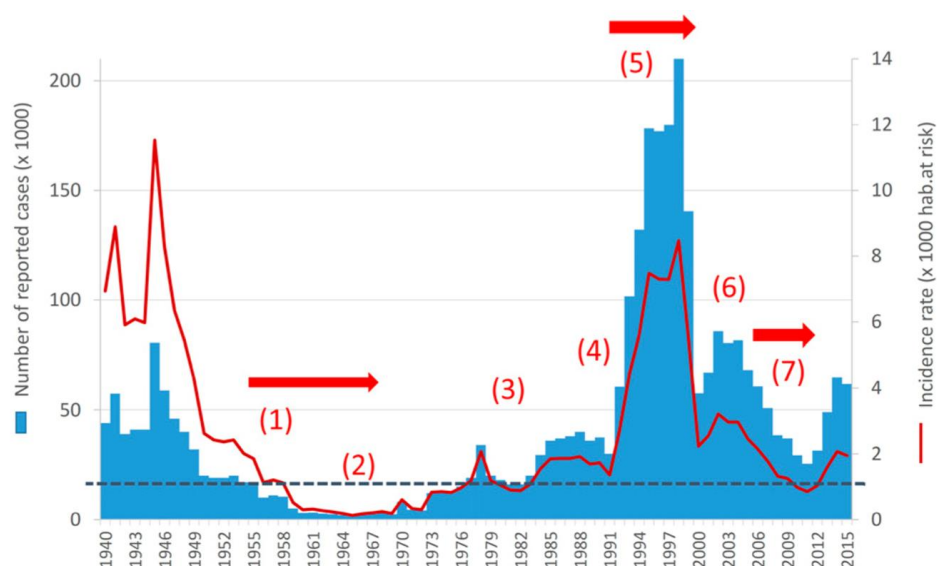


Figura 4. Tendencias históricas de incidencia de malaria reportada en Perú: 1940-2015. (1) 1954-1967, Programa de Erradicación de Malaria; (2) 1965: 1500 casos reportados; (3) 1980: Intervenciones de control por parte de centros de salud; (4) 1990: Primer reporte de malaria por *P. falciparum* en Loreto; (5) 1997: Fenómeno de El Niño/Resistencia de *P. falciparum* a CQ; (6) 2001-2003 Introducción de terapias combinadas con artemisina (ACT); (7) 2005-2010 Control intensivo de malaria en la Región Amazónica financiado por el Fondo Global. Tomado de: Rosas-Aguirre, A., Gamboa, D., Manrique, P., Conn, J. E., Moreno, M., Lescano, A. G., ... Vinetz, J. M. (2016). Epidemiology of *Plasmodium vivax* Malaria in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(6 Suppl), 133-144.

1.3. Justificación e Importancia de la Investigación

Conforme un país se redirige hacia un enfoque de eliminación de la malaria, y transita de una fase a otra, cambian los objetivos, estrategias e intervenciones a seguir para la fase correspondiente en que se encuentra (WHO, 2009). Perú se encuentra en la fase de control, en la cual es menester reducir la incidencia de malaria a un nivel que no suponga

un problema de salud pública, como resultado de la adopción de medidas de control e intervenciones continuas para mantener la disminución de casos (OMS, 2016, 2017).

En un escenario en el que se considera la posibilidad de iniciar un trayecto hacia la eliminación de malaria (reducción de la transmisión a cero en una zona geográfica definida), un diagnóstico preciso y la identificación de casos evidenciando la presencia de parásitos en pacientes enfermos que acuden a centros de salud (detección pasiva de casos), es cada vez más importante. Todos los pacientes sintomáticos con parasitemia demostrada deben considerarse casos de malaria y recibir un tratamiento.

Sin embargo, diversos estudios reportan una importante proporción de infecciones de malaria asintomáticas y submicroscópicas en áreas endémicas de la Amazonía peruana que contribuyen manteniendo la transmisión, constituyendo un reservorio de parásitos (Carrasco-Escobar et al., 2017; da Silva-Nunes et al., 2012; Soto-Calle et al., 2017; The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics, 2011); este panorama representa nuevos retos que demandan la búsqueda de herramientas de diagnóstico alternativos y un cambio en las estrategias de control actuales, en particular, en la forma de detectar casos de malaria, pasar de una detección pasiva a una activa. A medida que dichas medidas sean adoptadas, implicará una mejora en los actuales métodos de diagnóstico actuales que son usados en campo, capaces de detectar niveles bajos de parásitos en sangre de individuos con infecciones submicroscópicas.

En la actualidad, la estrategia de detección de casos de malaria en el Perú es llevada a cabo por parte del Ministerio de Salud (MINSA) enfocándose en los pacientes sintomáticos que acuden a los centros de salud, diagnosticados por microscopía, considerado el método de diagnóstico estándar de malaria (Ministerio de Salud, 2007). No obstante, debido a la baja sensibilidad reportada de la técnica estándar de oro, se evidencia una falta de identificación y tratamiento de aquellos individuos que tienen parasitemias no detectables por microscopía (Miranda, 2016).

Basado en el reciente documento técnico aprobado “Plan Malaria Cero”, se puede afirmar que existe la iniciativa de encaminar la situación actual de malaria en el país hacia un panorama de eliminación de la enfermedad. Dicho programa se distribuye en tres fases, teniendo en cuenta los distintos escenarios de endemidad, asimismo, cuáles son las estrategias principales que corresponden a cada momento (Figura 5).

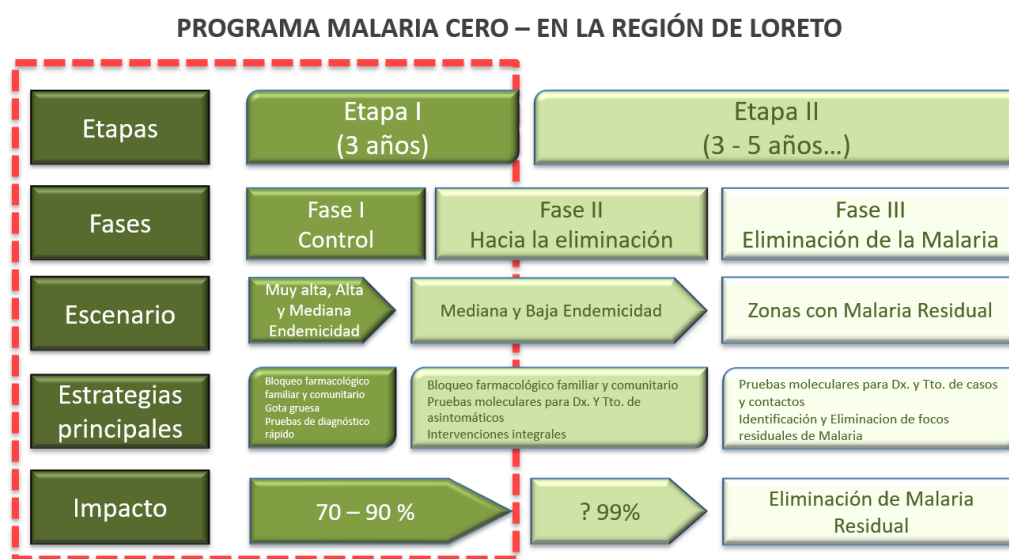


Figura 5. Cuadro resumen del Programa Malaria Cero, señalando las características y objetivos de cada fase etapa que comprende.

De este modo, métodos moleculares como LAMP, se presentan como una alternativa viable y ventajosa para el diagnóstico de infecciones de malaria encajando en la segunda fase del programa, donde el objetivo es la identificación y tratamiento de pacientes asintomáticos. Técnicas como microscopía y pruebas rápidas de diagnóstico no serán convenientes por su baja sensibilidad (Figura 6).

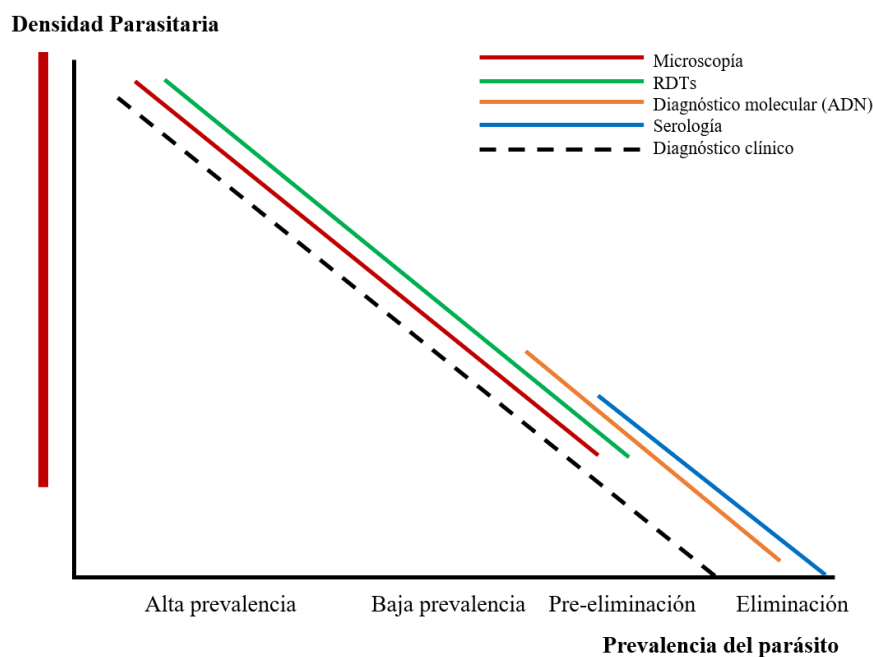


Figura 6. La posición de diferentes enfoques/pruebas de diagnóstico en relación con la morbilidad, la prevalencia del parásito, las densidades y las diferentes etapas hacia la eliminación de la malaria. Tomado de: The malERA Consultative Group on Diagnoses

and Diagnostics. (2011). A Research Agenda for Malaria Eradication: Diagnoses and Diagnostics. *PLOS Medicine*, 8(1).

El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de desarrollar un método de diagnóstico alternativo a los actuales usado en condiciones de campo, fácil de implementar y que no requiera de personal altamente entrenado, capaz de detectar niveles bajos de parásitos *P. falciparum* y *P. vivax* en sangre, no captados por métodos convencionales.

1.4. Objetivos

El objetivo general del trabajo de investigación fue diseñar una técnica LAMP *in-house* específica y sensible para la detección rápida y precisa de infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax*, adecuada para su aplicación en zonas con pocos recursos.

Además, como objetivos específicos se consideró la búsqueda, diseño y estandarización de cebadores para su uso en la técnica LAMP; determinar la sensibilidad analítica, especificidad analítica; y reportar el límite de detección del sistema LAMP *in-house* diseñado.

1.5. Delimitación de la investigación

El trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), ubicada en la Av. Honorio Delgado 430, Urbanización Ingeniería, Distrito de San Martín de Porres, Provincia de Lima, Departamento de Lima (Figura 7).

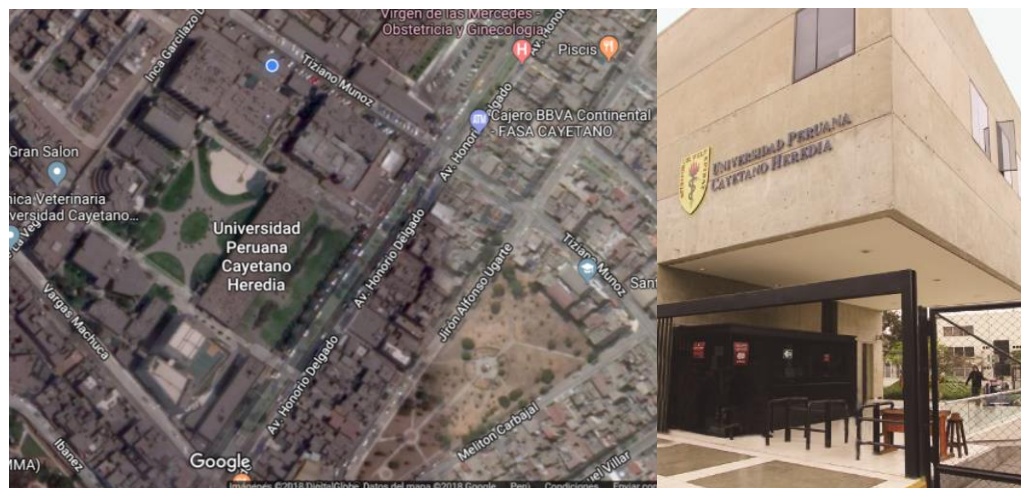


Figura 7. (Izquierda) Ubicación satelital de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). (Derecha) Frontis de la UPCH. Tomado de: *Google Earth*.

Todas las etapas comprendidas en la tesis fueron realizadas en un periodo de seis meses en el Laboratorio de Malaria, perteneciente a los Laboratorios de Investigación y Desarrollo ubicados en el campus de la mencionada universidad (Figura 8).

Algunos ensayos de la parte experimental requirieron del uso de las instalaciones de la Unidad de Epidemiología Molecular, ubicada también en el campus de la UPCH.



Figura 8. (Izquierda) Frontis del edificio de Laboratorios de Investigación y Desarrollo “Abraham Vaisberg Wolach” de la Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”. (Derecha) Grupo del Laboratorio de Malaria en el Campus UPCH.

2. Marco Teórico

2.1. Amplificación Isotérmica mediada por Horquillas (LAMP)

En el año 2000, Notomi y colaboradores desarrollaron un novedoso método capaz de amplificar desde unas cuantas copias de ADN a 10^9 copias en menos de una hora bajo condiciones isotérmicas con una alta especificidad llamándolo amplificación isotérmica mediada por horquillas o LAMP, por sus siglas en inglés (*Loop-mediated isothermal amplification*).

Este método utiliza una polimerasa de ADN con actividad de desplazamiento de la hebra y un conjunto de cuatro cebadores especialmente diseñados que reconocen un total de seis secuencias distintas en el ADN blanco. Dos de los cebadores forman estructuras de bucle para facilitar las subsiguientes rondas de amplificación. El producto de la reacción son estructuras de diferente tamaño que consisten en repeticiones de la secuencia blanco con una estructura similar a una coliflor (Notomi et al., 2000).

La amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) utiliza un set compuesto por cuatro cebadores especialmente diseñados para la técnica: dos *primers* externos denominados F3 y B3, correspondientes a dos regiones del ADN blanco; y dos *primers* internos llamados FIP (*forward inner primer*) y BIP (*backward inner primer*), cada uno de los cuales comprende dos regiones en el ADN blanco, como se muestra en la Figura 9. En los pasos iniciales de la reacción de LAMP, todos los cebadores son utilizados; sin embargo, en la posterior etapa cíclica de amplificación solo los cebadores internos son utilizados para el desplazamiento de las cadenas sintetizadas.

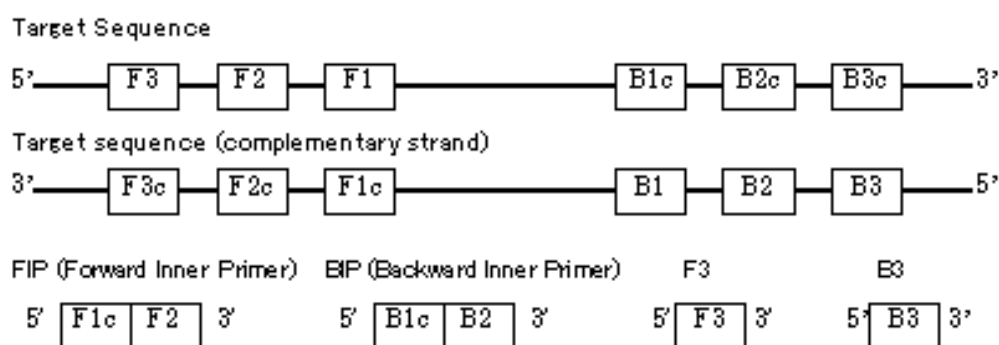


Figura 9. Diagrama explicativo sobre los cebadores necesarios para la reacción de LAMP.

La amplificación de la técnica es tan extensa que a simple vista se puede observar la turbidez del tubo, producida por la precipitación del pirofosfato de magnesio como subproducto de la reacción.

Se ha descrito también otra forma de analizar los resultados obtenidos por LAMP consistente en añadir SYBR Green I, un agente intercalante de la doble cadena de ADN

que emite fluorescencia cuando se une a ésta, al producto final y visualizarlo bajo luz UV. Sin embargo, para poder llevar a cabo esta práctica es necesario abrir el tubo que contiene el producto para poder añadir el colorante lo que podría conllevar a una contaminación cruzada. El uso de un master mix para LAMP con un colorante agregado previamente solucionaría esta limitación (Lau et al., 2011).

Existen diversos sistemas de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) aplicada a la detección de los parásitos de malaria, e incluso *kits* comerciales que han sido evaluados en diversos escenarios como el de EIKEN Chemical denominado LoopAMP®, mostrando una sensibilidad y especificidad altas; sin embargo, actualmente se cuenta solo con el diagnóstico para *P. falciparum* mediante este *kit* y el hecho de que se necesite un instrumento como un turbidímetro para la detección de amplificación incrementa el costo por reacción, mientras que hacerlo a simple vista sería muy subjetivo (Cuadros et al., 2017).

Se ha investigado el uso de colorantes sensibles al pH en conjunto con la amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) para facilitar la observación de los resultados de la reacción.

Tanner y colaboradores han medido la caída del pH causada por la amplificación de LAMP antes del inicio de la reacción y después del término de esta, observando una caída significativa del pH, desde el valor inicial de aproximadamente pH 8.8 hasta un valor final de pH 6.0 – 6.5. Esta disminución del pH (mayor a 2 unidades) permitiría el uso de colorantes indicadores de pH para monitorear el éxito de la amplificación (Lucchi et al., 2016; Tanner et al., 2015).

La amplificación isotérmica mediada por un bucle (LAMP) es un método molecular rápido y barato que permite la amplificación del ADN bajo condiciones isotérmicas. Esta técnica aparece como una alternativa viable para su uso en campo por las facilidades que brinda: no requiere de instalaciones especializadas, equipos costosos o personal altamente capacitado; además, se han reportado ensayos con un límite de detección en el rango de 5 - 10 parásitos/ μ L con una sensibilidad y especificidad de 95% y 96% respectivamente, haciendo de este método el idóneo para ser considerado (Oriero et al., 2014; Poschl et al., 2010).

2.2. *Targets* multicopia de amplificación

Pfr364 existe en 41 copias en el genoma de *P. falciparum*, cada una ubicada en la región repetitiva subtelomérica SB2 encontrada mayormente hacia la parte terminal de los cromosomas. El tamaño de la región SB2 en *P. falciparum* es variable (de 1 a 3 Kb), y en varias regiones se pueden hallar dos copias proximales de *Pfr364* (Demas et al., 2011).

Por otro lado, *Pvr47* es encontrado en 14 copias en el genoma de *P. vivax*. La mayoría de estos miembros están relacionados con *contigs* subteloméricos pequeños (menores a 16 kb) que aún no han podido ser asignados a un cromosoma debido a su naturaleza repetitiva. Dos de estos miembros de la familia se encuentran próximos a genes *vir* anotados, mientras que un tercero se encuentra proximal a la proteína transmembrana subtelomérica *Pvstp1* (Demas et al., 2011)

Al realizar el alineamiento de 41 secuencias de *Pfr364* en MEGA, concordante con el artículo citado anteriormente, se observa que las secuencias se agrupan en dos subfamilias claramente diferentes (Anexo 1).

En el momento de analizar este gen, se pudo ver que en la subfamilia 1, conformada por 22 copias, el porcentaje de similitud entre las secuencias es de 65.88%; y para la subfamilia 2, con 19 copias, el porcentaje es de 39.49%. En general, el porcentaje de similitud del locus *Pfr364* es de 49.3%.

En el caso de *Pvr47*, 14 secuencias alineadas tienen un porcentaje de sitios conservados entre las secuencias pertenecientes a este *target* fue calculado en 71.30% (Anexo 2).

2.3. Valores analíticos de una prueba diagnóstica

El uso impreciso de los términos “sensibilidad” y “especificidad” comúnmente generan confusión en el uso diagnóstico de pruebas de laboratorio, por lo que se hace necesario definir cada uno de ellos. La “sensibilidad analítica” representa la cantidad más pequeña de una sustancia en una muestra que puede ser medida de forma precisa en un ensayo. La “especificidad analítica” se refiere a la capacidad de un ensayo de detectar un organismo o sustancia en particular, por encima de otras, en una muestra. La sensibilidad y especificidad analítica de un ensayo son distintas a la sensibilidad y especificidad diagnóstica del mismo. Conforme a esto, la “sensibilidad diagnóstica” es el porcentaje de personas que tienen una enfermedad o desorden y son identificados por el ensayo como positivos para tal enfermedad o desorden. La “especificidad diagnóstica” es el porcentaje de personas que no tienen una condición dada y son identificados por el ensayo como negativos para tal condición (Saah & Hoover, 1997).

2.4. Hipótesis

El diseño de una técnica LAMP para el diagnóstico diferencial de infecciones por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, que responda al uso adecuado en ambientes con pocos recursos, es viable.

3. Marco Metodológico

3.1. Diseño de Estudio

Este trabajo es un estudio descriptivo observacional para los objetivos de estandarizar y optimizar un método LAMP diferencial para el diagnóstico de *P. falciparum* y *P. vivax*, y determinar la especificidad y sensibilidad analítica de cada uno de los sistemas de amplificación.

El trabajo de investigación fue dividido en tres etapas como se muestra en la Figura 10.

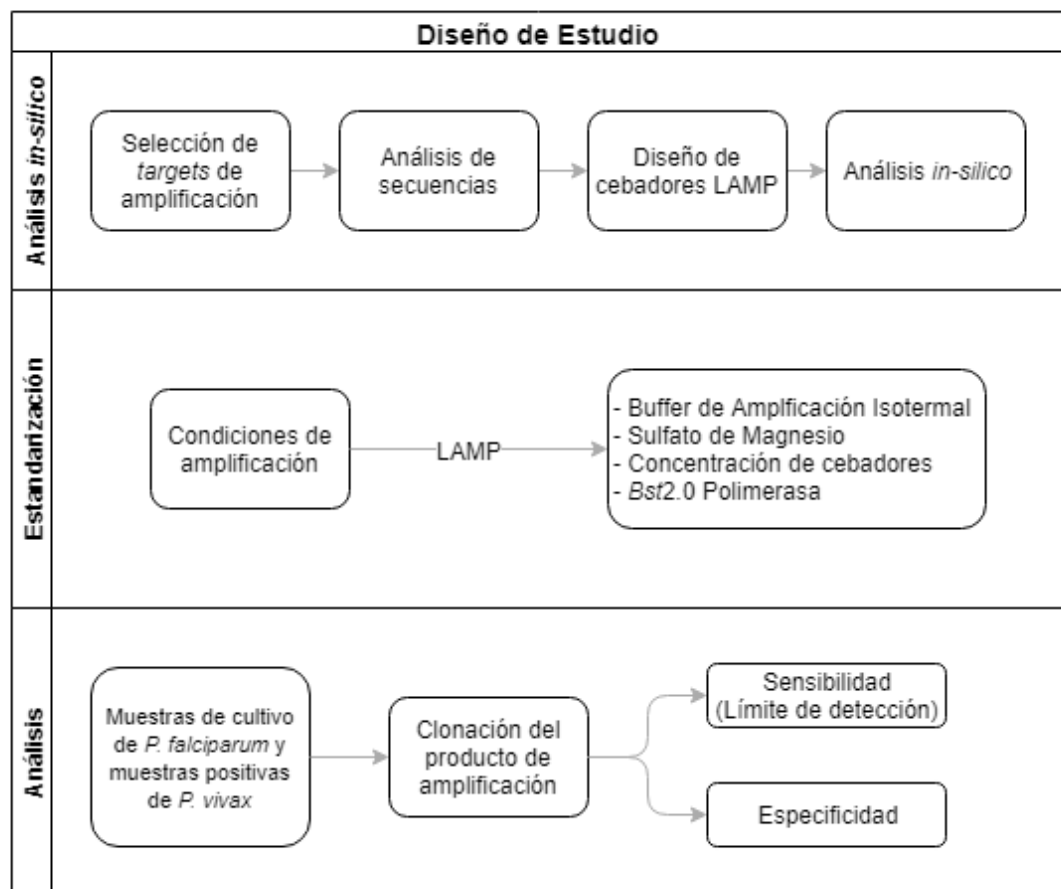


Figura 10. Diseño de estudio del trabajo de investigación dividido en tres etapas principales: el análisis *in-silico*, donde se diseñaron y analizaron mediante programas bioinformáticos los cebadores específicos a *P. falciparum* y *P. vivax*; la estandarización de los sistemas de amplificación, optimizando las condiciones necesarias como concentración de cebadores, buffer, colorante, magnesio y enzima; y los análisis de sensibilidad y especificidad analíticas correspondientes.

Adicionalmente se probó el sistema LAMP *in-house* diseñado con un grupo de muestras de pacientes pertenecientes a estudios anteriores, utilizando un método de extracción de ADN simplificado.

3.2. Métodos y Procedimientos

3.2.1. Análisis bioinformático *in-silico*

3.2.1.1. Selección de targets de amplificación

La selección de *targets* para *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* fue hecha a partir de un estudio de *data mining* (Demas et al., 2011), donde se reportan secuencias repetitivas y específicas para cada especie, que pueden servir como nuevos *targets* de PCR para la detección de malaria.

3.2.1.2. Análisis de secuencias

Utilizando el software libre *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) 7.0 se realizó el alineamiento (MUSCLE) de secuencias correspondientes al locus *Pfr364* y *Pvr47*, extraídas del material suplementario de *Applied Genomics: Data Mining Reveals Species-Specific Malaria Diagnostic Targets More Sensitive than 18S rRNA* (Demas et al., 2011).

Además, se alinearon secuencias de diferentes aislados de *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* descargadas de la base de datos en línea del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

3.2.1.3. Diseño de cebadores para LAMP

El software en línea *PrimerExplorer V5* es específico para el diseño de conjuntos de cebadores para el método de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP).

Este software generó los conjuntos de cebadores basado en la información de la secuencia objetivo, cumpliendo con los requisitos necesarios para el diseño de cebadores en general y ciertos requerimientos específicos para tener en cuenta para los cebadores LAMP.

i. Temperatura de *melting*

El tamaño de los cebadores fue definido teniendo en cuenta el valor de *T_m* que el cebador deba tener. Las secuencias F2 y B2 tienen un valor que va dentro del rango de 60-65°C, que viene a ser la

temperatura óptima de la enzima *Bst* polimerasa. En cambio, el valor de T_m de F1c y B1c es ligeramente más alta que el par anteriormente mencionado, para favorecer la formación inmediata de la estructura de horquilla luego del desplazamiento de la hebra simple de ADN del molde.

Además, el valor de T_m de los cebadores externos (F3 y B3) es menor que F2 y B2 para asegurar que ocurra primero la hibridación y síntesis de los cebadores internos que la de los externos.

ii. Distancia entre cebadores

La distancia recomendada entre el extremo 5' de F2 y B2 es de 120 – 180 pb, y la distancia entre F2 y F3, así como entre B2 y B3 es de 0 – 20 pb. La distancia para las regiones de formación de bucle (5' de F2 a 3' de F1, 5' de B2 a 3' de B1) es de 40 – 60 pb (Figura 11).

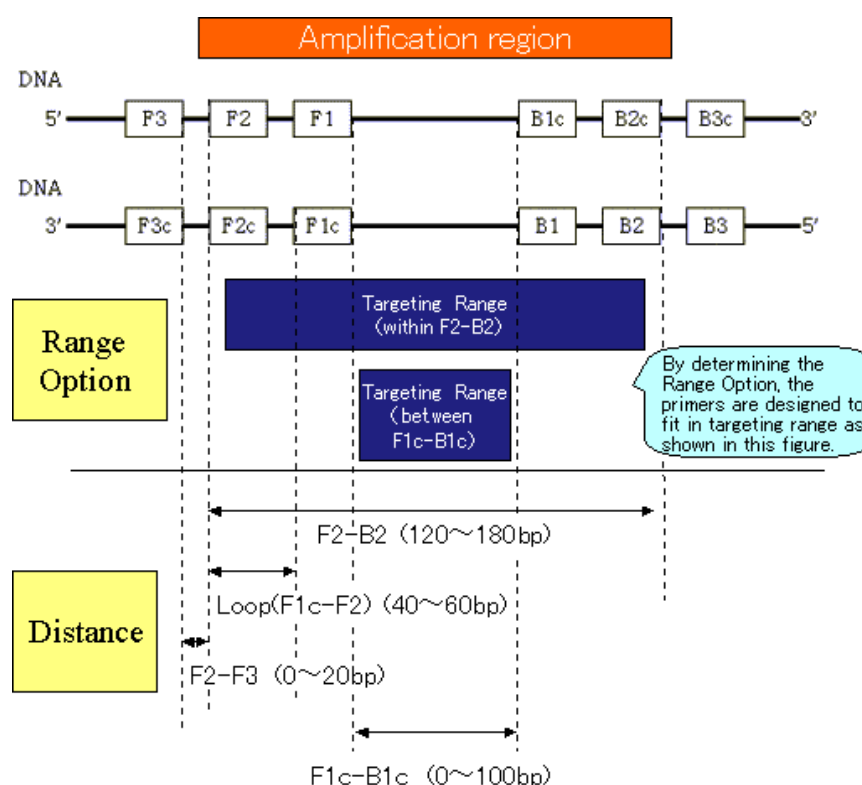


Figura 11. Distancias recomendadas (pb) entre los cebadores de la reacción de LAMP. Tomado de la página web de EIKEN Chemical Co. (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/>).

Se ingresó la secuencia consenso del locus *Pfr364* resultante del alineamiento realizado en MEGA 7 en el software en línea PrimerExplorer V5 para generar los cebadores LAMP específicos para el

target seleccionado. Lo correspondiente se hizo con la secuencia de *Pvr47*.

3.2.1.4. *Análisis de estructuras secundarias y especificidad*

Se utilizaron los softwares mencionados a continuación para verificar la formación de estructuras secundarias en el ADN *target*, en los cebadores o la interacción entre ambos. Asimismo, para confirmar que sean específicos al *target* seleccionado.

i. Primer Blast

Esta es una herramienta de uso libre en línea es proporcionada por el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) en el *enlace*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Fue utilizada para confirmar la especificidad de los cebadores generados en la etapa anterior y de esta forma descartar los que presenten inespecificidades.

ii. OlygoAnalyzer 3.1

Es una herramienta de uso libre desarrollada por la compañía *Integrated DNA Technologies* (IDT) disponible en el *enlace*: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>. Permitió conocer propiedades de los cebadores y otros datos útiles como contenido de GC, peso molecular, secuencia complementaria, *hairpin*, homodímeros y heterodímeros al momento de ingresar la secuencia en la herramienta.

3.2.1.5. *Ubicación de los cebadores en las secuencias de Pfr364 y Pvr47*

Los programas mencionados a continuación fueron usados principalmente para conocer la ubicación de los cebadores en la secuencia *target* y su posición en relación con los demás *sets* de cebadores. Algunos programas ofrecían herramientas distintas, por lo que se consideraron:

i. CLC Mainworkbench

Se tuvo acceso limitado a este software y se utilizó para mapear los cebadores en la secuencia alineada del *target* y conocer su posición en el *locus* correspondiente.

ii. GeneDoc

Se tuvo total acceso a este programa y se pudo evaluar y conocer la posición de los cebadores de cada *set* diseñado.

Los cebadores que mostraron las características más favorables para su uso en el sistema LAMP fueron seleccionados y mandados a sintetizar a Invitrogen mediante la empresa BELOMED SRL en Perú.

3.2.2. Estandarización de las condiciones de amplificación

Los cebadores llegaron al laboratorio liofilizados y fueron resuspendidos en agua de grado molecular según las indicaciones del fabricante en condiciones de esterilidad.

A continuación, para cada conjunto de cebadores se realizó un ensayo con la finalidad de probar su desempeño experimentalmente utilizando muestras de ADN de pacientes para *P. vivax* y ADN extraído de cultivo de *P. falciparum* con una concentración conocida.

Para corroborar la amplificación del producto en la reacción de LAMP, se corrió un gel de agarosa al 2% en el que se visualizó el *smear* o patrón característico de LAMP eliminando así la posibilidad de que la amplificación sea debido a productos inespecíficos en la reacción. Asimismo, con la finalidad de evidenciar la caída de pH que se produce en la reacción de amplificación catalizada por una polimerasa, se midió con tiras reactivas el pH al inicio y al final de la reacción, obteniendo un valor de pH 8.5 al inicio y pH 6.5 al término de esta.

De esta forma, se redujo la cantidad de *sets* de cebadores a uno solo para cada especie, que fue seleccionado porque funcionó mejor en las pruebas experimentales.

En este punto, al tener un set de cebadores específico para cada especie se procedió a la clonación del producto de amplificación para su uso en los ensayos de estandarización descritos a continuación.

Debido a que los *primers* fueron diseñados específicamente para el sistema de amplificación isotérmica mediado por horquillas, el protocolo que se siguió en las pruebas de los cebadores fue el descrito por el fabricante *New England Biolabs* y se encuentra disponible en <https://www.neb.com/protocols/2014/11/21/typical-lamp-protocol-m0275>.

En un volumen final de 25 μ L, conteniendo *Buffer* de Amplificación Isotérmica 1X (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 50 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.1% Tween 20 pH 8.8 @25°C), 6 mM MgSO₄, 1.4 μ M cada dNTP, 2 μ M de cebadores internos FIP/BIP, 0.2 μ M de cebadores externos F3/B3, 8 unidades de *Bst* 2.0

DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA), 0.004% rojo neutro y 5 μ L de ADN molde.

Cuando se seleccionó el mejor *set* de cebadores para cada especie, se procedió con la estandarización del sistema.

Para esto, se tuvieron en cuenta distintos parámetros que pudieran influir en la reacción de forma desfavorable y se realizaron curvas de concentración de los reactantes.

i. Buffer de Amplificación Isotérmica 10X

Este buffer está optimizado para su uso con la enzima *Bst 2.0 DNA Polymerase* (M0537L).

El protocolo típico de LAMP proporcionado por *New England Biolabs* utiliza el buffer a una concentración final de 1X, en la cual está compuesto por 20 mM Tris-HCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 0.1% Tween 20, a un pH 8.8 a 25°C, condiciones necesarias para que se produzca la reacción en cadena de la polimerasa y consecuentemente la amplificación a una temperatura constante. El volumen final de la reacción fue de 25 μ L.

Este fue el punto de partida, y se seleccionaron tres concentraciones de buffer incluyendo la descrita en el protocolo típico (0.25X, 0.5X, 1X) con la finalidad de probar la capacidad amortiguadora del buffer y ver un viraje por parte del colorante indicador de pH debido a la amplificación.

ii. Colorante indicador de pH

El colorante utilizado fue el rojo neutro preparado a partir del *Neutral Red powder BioReagent* de Sigma Aldrich código N4638-1G.

A partir de un stock de rojo neutro al 0.1%, se realizaron diluciones para determinar la concentración óptima de colorante indicador de pH en la que el viraje causado por la amplificación (de amarillo naranja a fucsia) sea fácilmente distinguible. Para esto, se evaluaron tres concentraciones de rojo neutro (0.003%, 0.004%, 0.008%) siguiendo un estudio previo sobre verde de malaquita en un ensayo LAMP (Lucchi et al., 2016).

iii. Sulfato de Magnesio

El sulfato de magnesio utilizado es usado en conjunto con la enzima *Bst 2.0 DNA Polymerase* (Código de Producto: M0537L). Su concentración inicial es 100 mM.

El magnesio es un importante cofactor de la polimerasa de ADN, necesario para que la amplificación suceda. Una concentración muy baja de magnesio puede ser insuficiente para la reacción; así como, una concentración muy alta puede tener inhibir la reacción.

Fue necesario determinar la concentración óptima evaluando tres concentraciones de MgSO_4 (6 mM, 8 mM, 10 mM).

iv. Concentración de cebadores

La proporción óptima entre los cebadores externos e internos se determinó evaluando tres ratios de concentración entre cebadores (1:10, 1:5, 1:2.5)

v. *Bst* 2.0 Polimerasa

La enzima utilizada es proporcionada por *New England Biolabs* (M0537L) a una concentración inicial de 8000 U/mL.

Para determinar la concentración óptima de enzima en la reacción final se evaluaron cuatro concentraciones de enzima (4 U, 8 U, 10 U, 12 U).

Cada una de las estandarizaciones fue realizada en el orden en el que se describen y usando como muestra tres diluciones del ADN plasmídico clonado específico para cada especie por triplicado.

3.2.3. Análisis de especificidad y sensibilidad analíticas

Constituye la tercera fase de esta investigación, en la cual se clonó el producto de amplificación para *P. falciparum* y *P. vivax* en un vector plasmídico para su uso en ensayos de estandarización definiendo las condiciones óptimas de amplificación de cada sistema; asimismo, se determinó la sensibilidad y especificidad analíticas de cada uno de los sistemas.

3.2.3.1. ADN plasmídico como control positivo

El *kit* TA Cloning® con el vector pCR®2.1 proporcionó una estrategia de clonación rápida en un solo paso para insertar directamente un producto de PCR en un vector plasmídico con la finalidad de obtener controles positivos para cada especie y evaluar la sensibilidad de cada sistema.

i. Generación de los productos de PCR

El primer paso para la clonación del producto fue la generación de este mediante un ensayo de PCR convencional.

Se utilizaron los cebadores externos (F3 y B3) para el *target Pfr364* y *Pvr47*.

Para la confirmar la presencia del producto deseado se preparó un gel de agarosa al 2% y se corrió la electroforesis a 70 V por 50 minutos.

Luego de esto, se precipitaron los productos de amplificación con el protocolo descrito en el Anexo 3 para eliminar cualquier residuo de la reacción de PCR que pudiera interferir con el proceso de clonación.

ii. Ligación de los productos de PCR con el vector pCR®2.1

Lo siguiente fue insertar el producto de PCR generado en el vector de clonación en un proceso denominado ligación donde se utilizó el producto de PCR fresco de cada especie con otros reactantes, siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 3).

Tabla 2. Reactantes necesarios para la ligación del producto de amplificación con el vector.

Reactante	Volumen (μL)
Producto de PCR fresco	3
5X T4 DNA Ligase Reaction Buffer	2
pCR®2.1 vector (25 ng/μL)	2
Agua de PCR	2
ExpressLink™ T4 DNA Ligase (5 U)	1
Volumen final	10

La reacción fue incubada por 120 minutos a temperatura ambiente.

iii. Transformación de células competentes y obtención de plásmidos

Las células utilizadas para la clonación fueron OneShot® TOP10 de Invitrogen, las cuales son células químicamente competentes.

La transformación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 4). Luego se realizó una selección de las colonias usando el sustrato X-gal e IPTG (inductor de la β-galactosidasa) para visualizar las colonias debido a que una vez transformadas, las bacterias que portan el plásmido no son capaces de producir la enzima β-galactosidasa porque la región que sintetiza a la enzima se corta para dar paso a la secuencia de interés en el vector.

Las colonias que se tornaron azul son las que contenían el plásmido, pero no el inserto en éste; mientras que las que se mantienen blancas, no han podido degradar el sustrato y por lo tanto contienen el plásmido con el inserto de interés.

Se eligieron 10 colonias blancas de la placa de *P. falciparum* y de *P. vivax*, las cuales fueron picadas y sembradas en tubos estériles con 3 mL de medio LB y 3 µL de ampicilina, manteniendo esterilidad. Fueron incubados *overnight* a 37°C y 225 rpm.

Se observó crecimiento al concluir el tiempo de incubación y se separó 1 mL de cultivo en un tubo de 1.5 mL para su extracción.

Para la extracción rápida y a pequeña escala del ADN plasmídico de la bacteria, de cada colonia seleccionada por especie, se utilizó el protocolo *Minipreparation* del plásmido (Anexo 5), descrito en el Capítulo 1 del libro *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* y se confirmó la presencia del plásmido posterior a la extracción preparando un gel de agarosa al 1%.

iv. *Midipreparation* del plásmido

El siguiente paso fue extraer a gran escala el ADN plasmídico de la bacteria para obtener una buena concentración de éste.

A partir del ADN plasmídico extraído anteriormente en los *minipreps* (de cada colonia seleccionada), se hizo una dilución 1/30 de cada uno y fueron utilizados como muestra en un PCR convencional para amplificar el inserto clonado. El protocolo seguido fue el mismo que para la generación del producto de PCR.

Con la finalidad de confirmar la presencia del inserto en cada colonia picada, se preparó un gel de agarosa al 2%, se cargaron 5 µL de producto de PCR y se corrió a 70 V por 50 minutos.

Se escogió la colonia que se apreció mejor en el gel de agarosa para cada especie, *P. falciparum* y *P. vivax*.

Previo a hacer el *midiprep*, se sembraron por agotamiento en una placa las colonias elegidas y se incubaron a 37°C *overnight*.

Al día siguiente, se observó crecimiento de colonias y se seleccionó una para ser picada y sembrada en un *falcon* de 50 mL conteniendo 15 mL de medio LB y 15 µL de ampicilina. Se incubó en el *shaker* por 20 horas a 37°C y 225 rpm.

Se realizó el *midiprep* con el GeneJET *Plasmid MidiPrep Kit* para la obtención de una mayor concentración de ADN, siguiendo el protocolo

proporcionado por el fabricante, con algunas modificaciones, eluyendo en 300 μ L (Anexo 6).

v. Obtención de un stock de concentración conocida de plásmidos

A partir del ADN plasmídico eluido se realizó una dilución 1/100, la cual fue cuantificada por QUBIT *dsDNA Hs Assay Kit* y el resultado extrapolado para conocer la concentración estimada del stock de ADN extraído.

Con estos datos y conociendo el peso de un plásmido, fue posible determinar teóricamente el número de copias del inserto contenidas en el ADN extraído de cada especie mediante la fórmula descrita en el Anexo 7.

Partiendo del número de copias teórico calculado y la concentración del ADN (ng/ μ L), se diluyó el eluido hasta una concentración aproximada de 2 ng/ μ L. Este volumen obtenido de ADN plasmídico, a 1.72 ng/ μ L para *P. falciparum* y 1.94 ng/ μ L para *P. vivax*, fue almacenado en alícuotas de 15 μ L en tubos de 0.2 mL a -20°C para la preparación de curvas estándar de plásmido.

En ambas especies se asumió que solo había una copia insertada en el plásmido, sin embargo, para confirmar esto se enviaron 50 μ L de ADN plasmídico con el inserto de cada especie a secuenciar por *Macrogen* Corea.

vi. Preparación de curvas estándar de plásmido

Las curvas estándar de plásmido son diluciones seriadas 1:10 a partir del stock alícuotado anteriormente y fueron utilizadas en ensayos para confirmar las condiciones de estandarización que se definieron anteriormente y en ensayos que serán descritos a continuación sobre especificidad y sensibilidad analítica.

La preparación de una curva estándar se realizó el día anterior a los ensayos planificados y en un ambiente separado para evitar alguna contaminación posible.

Se dispensaron 90 μ L de agua de grado molecular en 9 tubos de 1.5 mL rotulados correctamente. A continuación, se tomaban 10 μ L de un tubo con 15 μ L de ADN plasmídico (~2 ng/ μ L) y se mezcló con el primer tubo conteniendo agua de grado molecular. El mismo procedimiento se repitió

con el siguiente tubo, pero ahora a partir de la dilución preparada previamente, y así sucesivamente con los demás tubos hasta obtener una curva estándar de nueve puntos para cada especie (Tabla 4 y 5).

Una curva preparada era mantenida por 15 días como máximo para su uso en ensayos.

Tabla 3. Diluciones seriadas 1:10 de ADN plasmídico conteniendo el *target* de *P. falciparum*.

Dilución	ng/ μ L	Copias/ μ l eq.	Parásitos/ μ L eq.
1	0.172	37391304.35	1869565.22
2	0.0172	3739130.43	186956.52
3	0.00172	373913.04	18695.65
4	0.000172	37391.30	1869.57
5	1.72E-05	3739.13	186.96
6	1.72E-06	373.91	18.70
7	1.72E-07	37.39	1.87
8	1.72E-08	3.74	0.19
9	1.72E-09	0.37	0.02

Tabla 4. Diluciones seriadas 1:10 de ADN plasmídico conteniendo el *target* de *P. vivax*.

Dilución	ng/ μ L	Copias/ μ l eq.	Parásitos/ μ L eq.
1	0.194	42825607.06	3893237.01
2	0.0194	4282560.71	389323.70
3	0.00194	428256.07	38932.37
4	0.000194	42825.61	3893.24
5	1.94E-05	4282.56	389.32
6	1.94E-06	428.26	38.93
7	1.94E-07	42.83	3.89
8	1.94E-08	4.28	0.39
9	1.94E-09	0.43	0.04

3.2.3.2. Especificidad analítica de los cebadores de LAMP

Este ensayo tuvo como finalidad verificar la especificidad de los cebadores diseñados hacia el *target* para cada especie en el ensayo de LAMP. Para esto, se utilizaron muestras de ADN de *P. falciparum* cepa 3D7, *P. vivax* cepa Sal I, *P. malariae* y *P. ovale* provenientes del CDC.

La especificidad de cada sistema se comprobó visualizando un resultado semejante al obtenido con el blanco de reacción en muestras distintos al *target* deseado.

3.2.3.3. *Sensibilidad analítica de los cebadores de LAMP*

Para determinar el límite de detección del ensayo de LAMP para *P. falciparum* y *P. vivax*, se utilizaron diluciones seriadas 1/10 a partir del stock de ADN plasmídico (~2 ng/μL) disponible. De esta forma se obtuvieron diluciones conteniendo desde ~0.1 parásitos/μL hasta ~20 000 parásitos /μL aproximadamente.

Los ensayos fueron realizados por triplicado.

3.2.4. Evaluación de un grupo de muestras

Adicionalmente, se decidió analizar un grupo de 89 muestras de paquete globular provenientes de una colecta anteriormente llevada a cabo, las cuales contaban con el diagnóstico por microscopía en campo y por qPCR, utilizando un protocolo estandarizado en el Laboratorio de Malaria; basado en la técnica reportada por Mangold et al., 2005.

Estas muestras fueron tratadas con un protocolo simplificado para la extracción del ADN y su posterior uso en la técnica de LAMP.

El método simplificado para la extracción de ADN fue el denominado “*Boil and Spin*” o en español, “Hervido y Centrifugado” (Serra-Casas et al., 2017).

Este método, con algunas modificaciones, consistió en la adición de 60 μL de buffer de lisis (4 mM Tris-Base, 0.08 M NaCl, 0.08% SDS) a 60 μL de la muestra en un tubo de 1.5 mL, y la mezcla homogenizada vigorosamente con una pipeta; esto se hizo con cada muestra. A continuación, se colocaron los tubos en un flotador y este en un recipiente conteniendo agua en estado de ebullición por 5 minutos. Previamente, se cubrió cada tubo con *Parafilm*® para evitar cualquier contaminación en este paso de hervido.

Los tubos fueron retirados del agua y centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. Después, el sobrenadante de cada tubo fue aspirado con una pipeta, sin tocar el coágulo, y depositado en un tubo rotulado con el código correspondiente de cada muestra, 5 μL de este sobrenadante fue añadido a la reacción de LAMP para su evaluación (Anexo 8).

Las muestras fueron procesadas en grupos de 24, siguiendo el formato: en cada *strip* de ocho tubos, el primer pocillo corresponde al control negativo (ADN

humano), el último al control positivo (ADN plasmídico con el *target* deseado) y los seis pocillos remanentes en medio, a muestras problema. En cada ensayo de LAMP, con este formato, se evaluaban 4 *strips* para cada especie (*P. falciparum* y *P. vivax*); es decir, 8 *strips* en total (Anexo 9).

Las muestras procesadas eran evaluadas con LAMP lo más pronto posible y después almacenadas a -20°C.

Con este ensayo se calculó la sensibilidad y especificidad clínica de los sistemas de LAMP diseñados para la detección de *P. falciparum* y *P. vivax*, comparando con los resultados por microscopía; y utilizando un qPCR estandarizado como método de referencia. La sensibilidad diagnóstica fue calculada como:

$$S = \frac{(\text{número de verdaderos positivos})}{(\text{número de verdaderos positivos} + \text{número de falsos negativos})}$$

Mientras que la especificidad diagnóstica fue calculada como:

$$E = \frac{(\text{número de verdaderos negativos})}{(\text{número de verdaderos negativos} + \text{número de falsos positivos})}$$

con el uso de un software denominado EPIDAT 3.1, a través de la herramienta pruebas diagnósticas simples.

3.3. Aspectos éticos

El presente proyecto forma parte de la primera etapa del desarrollo del “Círculo para la implementación de una plataforma de diagnóstico molecular diferencial y TICs para la vigilancia de zika, dengue, chikungunya y malaria”, denominada “Elaboración de una plataforma de diagnóstico molecular diferencial para zika, dengue, chikungunya y malaria” con la aprobación del Comité de Ética de UPCH, con el código de inscripción 100405. Anexo 10.

4. Resultados

En respuesta al objetivo general establecido, se ha desarrollado con éxito un sistema LAMP colorimétrico para el diagnóstico diferencial de infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax*, con la finalidad de simplificar la visualización de resultados y ser utilizado en ambientes donde no es viable implementar técnicas moleculares (PCR en tiempo real) más sensibles que la actual herramienta de diagnóstico considerada *gold standard* (microscopía).

Además, se determinaron valores de sensibilidad y especificidad analíticas del sistema LAMP; y se evaluaron un grupo de muestras obteniendo valores de sensibilidad y especificidad clínica en comparación a un método qPCR de referencia.

4.1. Análisis bioinformático *in-silico* para el diseño de cebadores LAMP

Los cebadores diseñados utilizados en el sistema LAMP fueron obtenidos en base a los genes *Pfr364* para *P. falciparum* y *Pvr47* para *P. vivax*.

En total, se diseñaron 10 conjuntos de cebadores de LAMP para *P. falciparum* (Tabla 7) y 8 conjuntos de cebadores para *P. vivax* (Tabla 8). El rango de la longitud de los cebadores estuvo entre 18 a 25 nucleótidos y el tamaño del producto se mantuvo menor a 250 pares de bases. Se consideró un porcentaje de GC entre 30% y 50%.

Sin embargo, se redujo el número de cebadores a un *set* para cada especie (Tabla 6) porque algunos conjuntos de cebadores presentaron secuencias que eran afines a otros organismos (por ejemplo, *Schistosoma curassoni*, *Ascaris lumbricoides*, entre otros), o tenían numerosas estructuras secundarias con una alta estabilidad y probabilidad de formación (menor a -3 kcal/mol); lo mismo con los homodímeros y heterodímeros, cuando la energía libre de Gibbs (ΔG) es menor a -8 kcal/mol (cebadores A3, A4, A5, B2, B3 y B8).

Tabla 5. Secuencias de los cebadores LAMP correspondientes a *P. falciparum* y *P. vivax*.

Cebador	Secuencia 5'-3'
PF364LF3	CACTAGGTACGCCAACAT
PF364LB3	ACCCACAATTTTGATTGAGATG
PF364LFIP	GTAGACACCATATGGTACCACGTA-GGATGTGTCTATCATATAGTCCG
PF364LBIP	TTGTACCCAATTTTCCCCTAGCA-GTGTGTGCAACATCATAATCATCA
PV47LF3	AACACCTCCCACCAATCA
PV47LB3	GTGAATTATCGAAGGCATAA
PV47LFIPA	TACGCGGAAAATCAGAACAATTCAT-GTGCCAATTTTTTTTTCGCG
PV47LBIPA	ATCTTTCGCTTATCCATTCATCGA-TAGTGACAAAACATAAACACAGC

Tabla 6. Características de los cebadores diseñados para el *target Pfr364 (Plasmodium falciparum)*. *Los conjuntos resaltados fueron sintetizados.

Nombre del set	Orientación	Primer	Secuencia (5'->3')	Tamaño (nt)	Tm	%GC	ΔG - (Hairpin)	ΔG - (Homo)
A1	Forward	F3	CACTAGGTACGCCAACAT	18	55.49	50	-0.81	-4.16
		F2	GGATGTGTCTATCATATAGTCCG	23	57.17	43	-0.37	-4.64
	Reverse	B3	TGTGCAACATCATAATCATCAA	22	56.07	32	-0.35	-7.05
		B2	GCTTTGAAGTGCATGTGAAT	20	56.63	40	0.01	-7.05
A2	Forward	F3	AGGTACGCCAACATGGAT	18	53.8	50	-1.3	-5.38
		F2	GTGTCTATCATATAGTCCGTGA	22	50.9	40.9	-0.37	-4.03
	Reverse	B3	GTGTGTGTAACATCATAATCATCAA	25	51.6	32	-0.35	-3.3
		B2	GCTTTGAAGTGCATGTGAA	19	51.4	42.1	0.01	-7.05
A3	Forward	F3	GGGGGTATATCAATTTTTTCCAATT	25	57.92	32	0.19	-5.36
		F2	TTTTGGTCCATTTTTTGGACATT	23	57.77	30	-4.45	-7.94
	Reverse	B3	ATATATGTTACCACAACAGTGAT	23	55.02	30	-1.33	-6.35
		B2	AGGAACAATTGCCCATG	18	56.91	50	0.17	-9.27
A4	Forward	F3	AATTTGTGTTTCCACTATTTGC	22	55.62	32	-1.23	-5.36
		F2	TGGGACCGTTCTATTAGTCAA	21	57.91	43	-0.73	-3.61
	Reverse	B3	ACCATATGGTACCACGTAGT	20	57.17	45	-1.25	-16.64
		B2	ATGTATAGATGATCACGGACT	21	55.11	38	0.59	-8.58
A5	Forward	F3	TTCCACTATTTGCGGTCC	18	56.16	50	0.65	-3.61
		F2	CTATTAGTCAAAAAACGACATCCAA	25	57.68	32	-0.72	-3.61
	Reverse	B3	ACCATATGGTACCACGTAGT	20	57.17	45	-1.25	-16.64
		B2	ATGTATAGATGATCACGGACT	21	55.11	38	0.59	-8.53
A6	Forward	F3	AGGTACGCCAACATGGAT	18	57.66	50	-1.3	-5.38
		F2	GTGTCTATCATATAGTCCGTGA	22	55.97	41	-0.37	-4.03
	Reverse	B3	ACATCGTGTGTGCAACAT	18	56.69	44	-0.46	-7.05
		B2	GCTTTGAAGTGCATGTGAAT	20	56.63	40	0.01	-7.05
A7	Forward	F3	CCCAAATTATACAATATAACTGCCA	25	57.2	32	-0.14	-5.36
		F2	AGGTACGCCAACATGGAT	18	57.66	50	-1.3	-5.38
	Reverse	B3	TGTGCAACATCATAATCATCAA	22	56.07	32	-0.35	-7.05
		B2	GCTTTGAAGTGCATGTGAAT	20	56.63	40	0.01	-7.05
A8	Forward	F3	CACTAGGTACGCCAACAT	18	55.49	50	-0.81	-4.16
		F2	GGATGTGTCTATCATATAGTCCG	23	57.17	43	-0.37	-4.64
	Reverse	B3	GTGTGTGCAACATCATAATCATCA	24	59.69	38	-0.35	-7.05
		B2	GCTTTGAAGTGCATGTGAAT	20	56.63	40	0.01	-7.05
A9	Forward	F3	CACTAGGTACGCCAACAT	18	55.49	50	-0.81	-4.16
		F2	GGATGTGTCTATCATATAGTCCG	23	57.17	43	-0.37	-4.64
	Reverse	B3	ACCCACAATTTTGATTGAGATG	22	56.88	36	-2.29	-5.37
		B2	GTGTGTGCAACATCATAATCATCA	24	59.69	38	-0.35	-7.05
A10	Forward	F3	TCCAATTTATAGGTGAAACGAA	22	55.14	32	0.42	-5.36
		F2	CCGGAAATTCGGGTTTTAGAC	21	58.72	48	-1.39	-9.75
	Reverse	B3	GTGCACCAAAAGTGCTAG	18	55.34	50	-3.82	-9.73
		B2	GGGAAAATTGGGTACAATGA	20	55.12	40	-1.44	-5.37

Tabla 7. Características de los cebadores diseñados para el *target Pvr47 (Plasmodium vivax)*. *Los conjuntos resaltados fueron sintetizados.

Nombre del set	Orientación	Primer	Secuencia (5'->3')	Tamaño (nt)	Tm	%GC	ΔG- (Hairpin)	ΔG- (Homo)
B1	Forward	F3	CTCCCACCAATCATATAACATG	22	55.99	41	-0.05	-5.38
		F2	CGTGTGCCAATTTTTTTTGC	21	57.82	38	0.74	-5.36
	Reverse	B3	CGTGTGAATTATCGAAGGC	19	55.55	47	0.06	-6.76
		B2	TAGTGACAAAACATAAACACAGC	23	57.21	35	-1.03	-3.3
B2	Forward	F3	GATGTTATGGGGGTATTTTCC	21	55.66	43	0.47	-3.07
		F2	CCCCAAAGTTATAATCATGAGG	22	55.95	41	0.83	-8.53
	Reverse	B3	ACAAGTGTAGCATAAAAATCCAA	23	56.49	30	0.6	-3.3
		B2	GCACAGAATAATCGTTCATTGG	22	57.51	41	-0.34	-3.61
B3	Forward	F3	GTATTTTCCCCCCCCAAAGT	19	56.47	47	1.61	-3.89
		F2	ATAATCATGAGGTGAATATCCTCT	24	56.59	33	-2.31	-8.53
	Reverse	B3	GCACTAGTAGATTAAGGCAAGTT	23	57.99	39	0.17	-6.84
		B2	CGACACTAACAAGTGTAGCAT	21	57.48	43	-2.34	-6.24
B4	Forward	F3	CCCAGCCATATAATTTTTTTATGC	24	56.72	33	-0.58	-5.36
		F2	AATGAACGATTATTCTGTGCTT	22	56.05	32	-0.14	-3.61
	Reverse	B3	TAGCGGAAATACACACGT	18	55.08	44	-0.22	-6.3
		B2	TAATGCAATATGTGACTGTACCA	23	57.48	35	-0.32	-7.05
B5	Forward	F3	AACACCTCCCACCAATCA	18	53.7	50	0	-1.47
		F2	ATAACATGTTAGCGTGTGC	19	50.7	42.1	-1	-3.61
	Reverse	B3	TGTGAATTATCGAAGGCATAA	21	49.5	33.3	0.41	-6.76
		B2	TAGTGACAAAACATAAACACAGC	23	51.6	34.8	-1.03	-3.3
B6	Forward	F3	AACACCTCCCACCAATCA	18	57.51	50	0	-1.47
		F2	GTGCCAATTTTTTTTGTGCGG	20	57.09	40	0.74	-5.36
	Reverse	B3	GTGAATTATCGAAGGCATAA	20	52.47	35	0.41	-6.76
		B2	TAGTGACAAAACATAAACACAGC	23	57.21	35	-1.03	-3.3
B7	Forward	F3	AACACCTCCCACCAATCA	18	53.7	50	0	-1.47
		F2	TATAACATGTTAGCGTGTGC	20	50.4	40	-1	-3.61
	Reverse	B3	GTGTGAATTATCGAAGGCATAA	22	50.8	36.4	0.41	-6.76
		B2	TAGTGACAAAACATAAACACAGC	23	51.6	34.8	-1.03	-3.3
B8	Forward	F3	CTGATTTTCCGCGTAACAATG	21	57.5	43	1.13	-10.36
		F2	TAGAATATCTTTCGCTTATCCATTC	25	56.48	32	-0.02	-4.99
	Reverse	B3	TCACCTCATGATTATAACTTTGG	23	55.83	35	-0.23	-8.53
		B2	GGAAAATACCCCCATAACATC	21	55.66	43	0.67	-3.07

4.2. Estandarización de las condiciones de amplificación

Las mejores condiciones de amplificación para el LAMP de *P. falciparum* fueron las siguientes: *buffer* de amplificación isotérmica 0.5X (10 mM Tris-HCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0.05% Tween 20 pH 8.8 a 25°C), 7 mM MgSO₄, 1.4 μM cada dNTP, 2 μM de cebadores internos FIP/BIP, 0.2 μM de cebadores externos F3/B3, 12 U de *Bst* 2.0 DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA), 0.003% rojo neutro y 5 μL de ADN molde; en un volumen final de 25 μL a una temperatura constante de 60°C por 55 minutos.

Para el LAMP de *P. vivax*, *buffer* de amplificación isotérmica 0.5X (10 mM Tris-HCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0.05% Tween 20 pH 8.8 a 25°C), 5 mM MgSO₄, 1.4 μM cada dNTP, 2 μM de cebadores internos FIP/BIP, 0.2 μM de cebadores externos F3/B3, 12 U de *Bst* 2.0 DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA), 0.003% rojo neutro y 5 μL de ADN molde; en un volumen final de 25 μL a una temperatura constante de 60°C por 45 minutos.

Con respecto a la reacción, se consideró un resultado positivo cuando el color naranja pálido inicial vira a un color rosado fucsia correspondiente a la caída del pH en la reacción producida por la amplificación.

4.3. Análisis de especificidad analítica

La especificidad analítica de los cebadores diseñados para *Pfr364* y *Pvr47* fue de 100% para cada uno, debido a que amplificó el analito correspondiente en todas las repeticiones sin mostrar reacción cruzada.

En el caso de los cebadores para *P. falciparum*, solo se observó amplificación en la muestra correspondiente a *P. falciparum* cepa 3D7.

Sucedió lo mismo con los cebadores para *P. vivax*; solo se observó resultados positivos con la muestra de *P. vivax* cepa Sal I en el tiempo de incubación indicado para cada *set* (Tabla 9).

Además, no se observó ninguna reacción cruzada con el ADN humano malaria-negativo (Anexo 11).

Tabla 8. Resultados de los ensayos de especificidad de los cebadores de Pfr364 y Pvr47 evaluados contra otras especies de malaria.

Muestra de ADN	Resultado LAMP	
	<i>Pfr364</i>	<i>Pvr47</i>
<i>P. falciparum</i>	+	-
<i>P. vivax</i>	-	+
<i>P. ovale</i>	-	-
<i>P. malariae</i>	-	-
Humano	-	-

4.4. Análisis de sensibilidad analítica

Utilizando las diluciones seriadas preparadas previamente de plásmido conteniendo el *target* de *Pfr364*, el límite de detección se determinó en 18.70 parásitos equivalentes/ μL (1.72×10^{-6} ng/ μL moléculas de ADN).

Del mismo modo, para *Pvr47* el límite de detección se fijó en 3.89 parásitos/ μL (1.94×10^{-7} ng/ μL moléculas de ADN).

El ensayo para cada especie se realizó por triplicado y hubo consistencia entre las repeticiones (Anexo 12).

4.5. Evaluación de un grupo de muestras

Del total de 89 muestras, 42 fueron positivas por el método qPCR de referencia (*P. falciparum* n=9; *P. vivax* n=33) solo 9 fueron detectadas por la herramienta de diagnóstico en campo (microscopía) y 18 por ambos sistemas LAMP diseñados.

Cuando fueron comparados con el método qPCR de referencia, el sistema LAMP *P. falciparum* tuvo una sensibilidad diagnóstica de 44.44% (6.43 – 82.46) y especificidad de 90% (82.8 – 97.2) y el sistema LAMP *P. vivax* una sensibilidad de 42.42% (24.05 – 60.8) y especificidad de 92.86% (85.22 – 100); mientras que la microscopía comparado con el mismo método de referencia obtiene una sensibilidad de 21.43% (7.83 – 35.03) y especificidad de 100% (98.94 – 100) (Tabla 10).

De las 24 muestras qPCR positivas – LAMP negativas: 19 tienen parasitemias menores a 1 parásito/ μL , 4 tienen una parasitosis entre 1 – 10 parásitos/ μL y 1 muestra contiene alrededor de 300 parásitos/ μL (Anexo 13).

Tabla 9. Rendimiento de LAMP *Pfr364*, *Pvr47* y microscopía, en comparación con el estándar de referencia qPCR.

		qPCR de referencia		Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)
		Positivo	Negativo		
		n = 9	n = 80		
LAMP <i>Pfr364</i>	Positivo	4	8	44.44% (6.43 - 82.46)	90% (82.8 - 97.2)
	n = 12				
	Negativo	5	72		
	n = 79				

		qPCR de referencia		Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)
		Positivo	Negativo		
		n = 33	n = 56		
LAMP <i>Pvr47</i>	Positivo	14	4	42.42% (24.05 - 60.8)	92% (85.22 - 100)
	n = 18				
	Negativo	19	52		
	n = 71				

		qPCR de referencia		Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)
		Positivo	Negativo		
		n = 42	n = 47		
Microscopía	Positivo	9	0	21.43% (7.83 - 35.03)	100% (98.94 - 100)
	n = 9				
	Negativo	33	47		
	n = 80				

5. Discusión

La etapa principal de un sistema de amplificación es la selección de *targets* de amplificación y diseño de cebadores. La técnica LAMP ha sido usada para la detección de infecciones por diferentes especies de *Plasmodium* (Chen et al., 2010; Oriero et al., 2014; Paris et al., 2007; Poschl et al., 2010). Aprovechando la información genómica existente sobre algunas especies de *Plasmodium* humano infectantes, especialmente *P. falciparum* y *P. vivax* (Carlton et al., 2008; Gardner et al., 2002), otros estudios han ahondado en la investigación de *targets* de amplificación diferentes al convencional (Demas et al., 2011; Zhang et al., 2017). El sistema de amplificación isotérmica LAMP obtenido con cebadores diseñados en base a un gen específico para cada especie, que por su multiplicidad muestran una alta sensibilidad analítica, ~18 parásitos equivalentes/ μ L para *P. falciparum* y ~4 parásitos equivalentes/ μ L en *P. vivax*. Este hecho se debe al mayor número de copias de cada gen que puede hallarse en el genoma del parásito, una ventaja con respecto a otros *targets* convencionales. En el caso de *Pfr364*, según el alineamiento realizado, los cebadores diseñados coinciden con 20 de las 41 secuencias que se encuentran distribuidas en los 14 cromosomas de *P. falciparum*. Por otro lado, los cebadores diseñados para *Pvr47* reconocen 11 de las 14 copias halladas en el genoma de *P. vivax*, en ambos casos se tiene mayor posibilidad de detectar la secuencia blanco en una muestra, aspecto favorable cuando hay una baja densidad parasitaria.

Estudios previos reportan diferentes valores sobre sensibilidad analítica, variando por el *target* utilizado y el método de extracción/preparación de la muestra; entre estos, se reporta para un LAMP *P. falciparum*, usando *targets* mitocondriales, un límite de detección de 5 parásitos/ μ L a partir de ADN purificado; mientras que, si la muestra es sangre en papel filtro y extraída con *kit*, el límite de detección del mismo sistema es de 10 parásitos/ μ L (Polley et al., 2010). Existe también un *kit* comercial, que usa como *target* secuencias de ADN mitocondrial, denominado *Loopamp MALARIA Pan/Pf* para la detección de infecciones por *Plasmodium* y por *P. falciparum*, el límite de detección reportado para el *kit* es ≤ 2 parásitos/ μ L, a partir de ADN extraído con *Chelex* (Aydin-Schmidt et al., 2014). El artículo que utiliza como *target* los genes *Pfr364* y *Pvr47* que se utilizan en el presente estudio reporta un límite de detección entre 0.1 – 10 parásitos/ μ L tanto para *P. falciparum* como para *P. vivax* en un sistema de amplificación PCR en tiempo real (Demas et al., 2011). La sensibilidad analítica hallada en este trabajo de investigación, usando diluciones de plásmido, fue más alta para el LAMP *P. vivax* con un límite de detección de 3.89 parásitos equivalentes/ μ L, que para el LAMP *P. falciparum*, llegando a detectar hasta 18.68 parásitos equivalentes/ μ L. Si se compara este límite de detección con microscopía, el sistema LAMP diseñado es más sensible que la herramienta de diagnóstico *gold standard* (con límite de detección entre 50 – 100 parásitos/ μ L); esto, en conjunto con las ventajas operacionales que supone implementar

LAMP (bajo entrenamiento del técnico), hace que la técnica diseñada sea viable para su evaluación en entornos remotos donde la malaria es endémica y la microscopía no consigue captar todas las infecciones por *Plasmodium* que pudieran presentarse (asintomáticos y submicroscópicos). En cuanto a la especificidad analítica del sistema LAMP para *P. falciparum* y *P. vivax*, fue determinada utilizando muestras de ADN de otras especies de *Plasmodium* que infectan a humanos (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*) referenciales proporcionadas por el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) de Estados Unidos, y, además, con ADN humano negativo para malaria.

En cuanto al diseño de los cebadores, un conjunto de *primers* específicos para LAMP consiste en 4 cebadores que son: 2 cebadores externos (comúnmente denominados F3 y B3) y 2 cebadores internos (FIP y BIP), los cuales van a reconocer 6 regiones en el ADN blanco. Adicionalmente se pueden agregar a la reacción 2 cebadores más, llamados *loop primers*, cuya finalidad es acortar el tiempo de formación de producto de amplificación, de esta manera se reduce el tiempo total de la reacción de LAMP a un aproximado entre 30 minutos a 1 hora (Notomi et al., 2000; Patel et al., 2013). En el trabajo de investigación se reporta un set para cada gen, se decidió no añadir los *loop primers* con la finalidad de disminuir la probabilidad de que se presenten productos inespecíficos. A pesar de esto, el tiempo de incubación total de la reacción es menor a una hora: para *P. vivax* es de 40 minutos y para *P. falciparum* de 55 minutos a la misma temperatura de 60°C, siendo posible la unión de ambas reacciones simultáneas en un solo sistema para determinar si una muestra es positiva o negativa. El hecho de que el sistema de amplificación diferencial para ambas especies emita un resultado en una hora es sumamente favorable al momento de aplicarlo en un entorno de campo; en conjunto con una técnica simplificada para preparar la muestra se hace posible obtener un diagnóstico preciso y posterior tratamiento.

Una de las características más atractivas de la técnica de LAMP es la posibilidad de observar el resultado de la reacción a simple vista. Originalmente, esta visualización de resultados se hacía por la observación de la precipitación del pirofosfato de magnesio como subproducto de la amplificación, usando instrumentos para medir la turbidez y determinar si una muestra es positiva o negativa (Lau et al., 2011; Notomi et al., 2000; Poschl et al., 2010; Zhou et al., 2014). Desde la implementación de la técnica de LAMP como una herramienta de diagnóstico, no solo de malaria, se ha buscado simplificar y reducir al mínimo el uso de equipos mediante los cuales se pueda mejorar la detección de productos de LAMP, que puede ser muchas veces dudosa en la determinación de una muestra como positiva o negativa. Se eligió trabajar con un colorante indicador de pH por las facilidades visuales y económicas que brinda al sistema de lectura de resultados.

Añadir reactantes como intercalantes de ADN (SYBR Green I) o complejo calceína – Mn²⁺ a la reacción y visualizar el resultado bajo luz ultravioleta ha sido ampliamente aplicado (Chen et al., 2010; Paris et al., 2007; Zhou et al., 2014). Sin embargo, en ocasiones, el hecho de agregar dichos componentes a la reacción al finalizar el tiempo de incubación conlleva el riesgo de abrir el tubo y contaminar el sitio de trabajo, así como instrumentos usados o incluso las muestras evaluadas. Las reacciones de LAMP son capaces de producir una caída de pH de alrededor de 2 – 3 unidades en soluciones muy débilmente tamponadas, lo cual permite el uso de estos colorantes indicadores de pH de transición de rango neutro (Lucchi et al., 2016; Tanner et al., 2015). En los ensayos preliminares con los cebadores para cada especie, se probaron los colorantes rojo neutro y verde de malaquita; sin embargo, rojo neutro fue el colorante indicador de pH escogido para usar en el sistema de LAMP colorimétrico desarrollado, por su rango de viraje entre 6.8 – 8.0 y una marcada diferencia entre una muestra negativa (color naranja pálido) y una muestra positiva (color rosado/fucsia), obtenida debido a la reducción de la capacidad tamponante del buffer de PCR (de 1X a 0.5X) a partir de los resultados descritos por Tanner y colaboradores. El uso de rojo neutro en LAMP es propicio debido a la clara diferencia de colores entre muestras positivas y negativas; no obstante, hay condiciones que deben tenerse en cuenta para obtener un resultado exitoso. Entre estas, se pueden destacar que 1) la temperatura de incubación debe ser constante, pudiendo variar $\pm 2^{\circ}\text{C}$, 2) el tiempo de incubación debe ser cronometrado y 3) el colorante indicador de pH debe ser filtrado. Con respecto a las dos primeras condiciones, el momento en que la temperatura rebasa aquellos límites, el tiempo de incubación fijado para el sistema es afectado pudiendo producir falsos positivos posiblemente al generarse dímeros de *primers* más temprano de lo estimado. Sobre el tercer punto, es importante el filtrado porque al preparar la solución de rojo neutro a la concentración deseada antes de filtrar, se observó que quedaban impurezas que podrían interferir en la visualización de los resultados de la reacción.

Los valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica obtenidos de una evaluación a un grupo de 89 muestras fueron comparados teniendo como referencia al qPCR. La sensibilidad diagnóstica del sistema LAMP diseñado para *P. falciparum* y *P. vivax* es de 44.44% y 42.42% respectivamente; mientras que la especificidad diagnóstica se encuentra por encima del 90% para ambos *targets*. Los valores obtenidos de sensibilidad clínica son bajos con respecto al diagnóstico provisto por el método qPCR de referencia, sin embargo, enfrentando el diagnóstico por microscopía con el método qPCR de referencia obtenemos una sensibilidad de 21.43%.

Esto se puede explicar por el hecho de que 19 muestras que fueron positivas con el método qPCR de referencia, pero negativas por microscopía y por el sistema LAMP tienen densidades parasitarias menores a 1 parásito/ μL . Conforme a lo mencionado, no fue posible detectar 5

infecciones de *P. falciparum* porque la parasitemia (<10 parásitos/ μL) estaba fuera del límite de detección determinado (18.68 parásitos/ μL). Para el LAMP de *P. vivax* cuyo LOD es inferior (3.89 parásitos/ μL), en una muestra con alrededor de 300 parásitos/ μL y otra con alrededor de 4 parásitos/ μL que resultaron LAMP negativas, es probable que en el proceso de extracción simplificado *Boil&Spin* se haya perdido ADN o habido inhibición por alguna impureza remanente en el sobrenadante. Es importante mencionar que en un rango de parasitemia comprendido entre 10 – 10 000 parásitos/ μL , el sistema LAMP *Pfr364* tiene una sensibilidad diagnóstica de 100%, y el LAMP *Pvr47*, de 90% comparado con el qPCR de referencia.

Caben resaltar dos principales limitaciones con respecto al sistema LAMP diseñado. La primera se relaciona con el manejo de los reactantes al momento de preparar la reacción de LAMP, esta es bastante susceptible a la contaminación y es menester el manejo apropiado de los reactivos y controles positivos, además de una asepsia adecuada en el espacio de trabajo para minimizar cualquier contaminación posible. Se podría superar esta limitación con la preparación previa de un mix de LAMP, ya sea líquido o liofilizado, de modo que la manipulación se limite a la dispensación del mix en el tubo correspondiente y la posterior adición de la muestra a evaluar. Como segunda limitante, si bien la determinación de un positivo y un negativo es clara a simple vista, cuando la densidad parasitaria es muy baja (<2 parásitos/ μL), algunas muestras positivas adquieren un color rosado muy débil que lo considerado positivo y visualmente es confuso definir si es un positivo o no. En estos casos, la amplificación es aleatoria y, al menos para el sistema diseñado, esta fuera del límite de detección. Sin embargo, podría implementarse al sistema LAMP algún tipo de dispositivo similar a un espectrofotómetro capaz de detectar estas mínimas variaciones en el color de la reacción y definir un punto de corte a partir del cual se pueda a una muestra positiva.

En conjunto, el sistema LAMP para *P. falciparum* y *P. vivax* diseñado representa un método molecular alternativo al *gold standard* actual, requiriendo de una menor capacidad técnica para llevarse a cabo y logrando captar un mayor número de infecciones aproximadamente en el mismo tiempo.

Sin embargo, antes de pasar a una etapa de aplicación de la técnica desarrollada como prueba de diagnóstica en un entorno adecuado se recomienda llevar a cabo más ensayos que provean datos más robustos sobre los valores diagnósticos de la prueba.

6. Conclusiones

- Se diseñó un conjunto de cebadores LAMP para la detección de *P. falciparum* y *P. vivax*, basados en la secuencia blanco *Pfr364* y *Pvr47* respectivamente.
- Se definieron las condiciones óptimas de amplificación de los cebadores de LAMP para *P. falciparum* y *P. vivax*.
- La especificidad analítica para los cebadores de *Pfr364* y *Pvr47* fue 100% con respecto a tres especies de *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*) que infectan humanos y ADN humano malaria negativo.
- El límite de detección del sistema LAMP para *P. falciparum* es de 18.68 parásitos equivalentes/ μL (1.72×10^{-6} ng/ μL moléculas de ADN); y para *P. vivax* es de 3.89 parásitos equivalentes/ μL (1.94×10^{-7} ng/ μL moléculas de ADN).

7. Referencias Bibliográficas

- Abdul-Ghani, R., Al-Mekhlafi, A., & Panagiotis, K. (2012). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malarial parasites of humans: Would it come to clinical reality as a point-of-care test?, *122*, 233-240.
- Aydin-Schmidt, B., Xu, W., González, I. J., Polley, S. D., Bell, D., Shakely, D., ... Mårtensson, A. (2014). Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Accurately Detects Malaria DNA from Filter Paper Blood Samples of Low Density Parasitaemias. *PLoS ONE*, *9*(8), e103905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103905>
- Bell, A., & Ranford-Cartwright, L. (2002). Real-time quantitative PCR in parasitology, *18*(8), 337-342.
- Campuzano, G., & Blair, S. (2010). Malaria: Consideraciones sobre su diagnóstico, *16*(7), 311-354.
- Carlton, J. M., Adams, J. H., Silva, J. C., Bidwell, S. L., Lorenzi, H., Caler, E., ... Fraser-Liggett, C. M. (2008). Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*, *455*, 757.
- Carrasco-Escobar, G., Miranda-Alban, J., Fernandez-Miñope, C., Brouwer, K. C., Torres, K., Calderon, M., ... Vinetz, J. M. (2017). High prevalence of very-low *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia carriers in the Peruvian Amazon: insights into local and occupational mobility-related transmission. *Malaria Journal*, *16*, 415. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2063-x>
- Chen, J.-H., Lu, F., Lim, C. S., Kim, J.-Y., Ahn, H.-J., Suh, I.-B., ... Han, E.-T. (2010). Detection of *Plasmodium vivax* infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Tropica*, *113*(1), 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.09.007>
- da Silva-Nunes, M., Moreno, M., Conn, J., Gamboa, D., Abeles, S., Vinetz, J., & Ferreira, M. (2012). Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally-driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for

- sustainable control strategies, *121*(3), 281-291.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.001>
- Demas, A., Oberstaller, J., DeBarry, J., Lucchi, N., Srinivasamoorthy, G., Sumari, D., ... Kissinger, J. (2011). Applied Genomics: Data Mining Reveals Species-Specific Malaria Diagnostic Targets More Sensitive than 18S rRNA, *49*(7), 2411-2418.
- Dowling, M. A. C., & Shute, G. T. (1966). A Comparative Study of Thick and Thin Blood Films in the Diagnosis of Scanty Malaria Parasitaemia, *34*, 249-267.
- El Peruano. (2017, de Agosto de). Normas Legales, pp. 21-22.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., ... Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, *419*(6906), 10.1038/nature01097. <https://doi.org/10.1038/nature01097>
- Griffing, S. M., Gamboa, D., & Udhayakumar, V. (2013). The history of 20th century malaria control in Peru. *Malaria Journal*, *12*(1), 303. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-303>
- Gutierrez, S., & Arróspide, N. (2003). *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria*. Lima: Instituto Nacional de Salud. Recuperado de <http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/Antimalaricos/manualMALARIA.pdf>
- Haanshuus, C., Mohn, S., Morch, K., Langeland, N., Blomberg, B., & Hanevik, K. (2013). A novel, single-amplification PCR targeting mitochondrial genome highly sensitive and specific in diagnosing malaria among returned travellers in Bergen, Norway, *12*(26).
- Lau, Y.-L., Fong, M.-Y., Mahmud, R., Chang, P.-Y., Palaeya, V., Cheong, F.-W., ... Chen, Y. (2011). Specific, sensitive and rapid detection of human plasmodium knowlesi infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in blood samples, *10*(197).
- Lau, Y.-L., Lai, M.-Y., Fong, M.-Y., Jelip, J., & Mahmud, R. (2016). Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Identification of Five Human Plasmodium Species in Malaysia, *94*(2), 336-339.
- Lucchi, N., Ljolje, D., Silva-Flannery, L., & Udhayakumar, V. (2016). Use of Malachite Green-Loop Mediated Isothermal Amplification for Detection of Plasmodium spp. Parasites, *11*(3).

- Mangold, K. A., Manson, R. U., Koay, E. S. C., Stephens, L., Regner, M., Thomson, R. B., ... Kaul, K. L. (2005). Real-Time PCR for Detection and Identification of Plasmodium spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2435-2440. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2435-2440.2005>
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., & Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415, 673.
- Ministerio de Salud. (2007). Norma Técnica de Salud para la atención de la Malaria y Malaria grave en el Perú.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. (2011). *Guía para el diagnóstico, manejo y prevención de la Malaria*. República Dominicana: Alfa y Omega.
- Ministerio de Salud y Protección Social, & Federación Médica Colombiana. (2013). *Malaria - Memorias*. Bogotá: ILADIBA. Recuperado de https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/memorias_malaria.pdf
- Miranda, J. (2016). Malaria submicroscópica en la Amazonía peruana, 1, 33-34.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA, 28(12).
- OMS. (2006). *Uso de las pruebas en el diagnóstico rápido de la malaria*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- OMS. (2009). *Informe Mundial sobre el Paludismo*. Genova, Suiza: Organización Mundial de la Salud.
- OMS. (2016). *Training module on Malaria Elimination* (p. 153). Geneva: Organización Mundial de la Salud.
- OMS. (2017). *Informe Mundial sobre el Paludismo 2017*. Genova, Suiza: Organización Mundial de la Salud.
- Oriero, E., Jacobs, J., Van Geertruyden, J.-P., Nwakanma, D., & D'Alessandro, U. (2014). Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination, 70, 2-13.

- Paris, D., Imwong, M., Faiz, A., Hasan, M., Bin Yunus, E., Silamut, K., ... Dondorp, A. (2007). Loop-Mediated Isothermal PCR (LAMP) for the Diagnosis of Falciparum Malaria, 77(5), 972-976.
- Patel, J. C., Oberstaller, J., Xayavong, M., Narayanan, J., DeBarry, J. D., Srinivasamoorthy, G., ... Lucchi, N. W. (2013). Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (RealAmp) for the Species-Specific Identification of Plasmodium vivax. *PLOS ONE*, 8(1), e54986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054986>
- Polley, S., Mori, Y., Watson, J., Perkins, M., González, I., Notomi, T., ... Sutherland, C. (2010). Mitochondrial DNA Targets Increase Sensitivity of Malaria Detection Using Loop-Mediated Isothermal Amplification, 48(8), 2866-2871.
- Poschl, B., Waneesorn, J., Thekisoe, O., Chutipongvivate, S., & Panagiotis, K. (2010). Comparative Diagnosis of Malaria Infections by Microscopy, Nested PCR, and LAMP in Northern Thailand, 83(1), 56-60.
- Recht, J., Siqueira, A., Monteiro, W., Herrera, S., Herrera, S., & Lacerda, M. (2017). Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control elimination, 16, 273. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1925-6>
- RENACE. (2018). *Boletín Epidemiológico del Perú* (No. 27). Lima: El Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades - MINSA.
- Rosas-Aguirre, A., Gamboa, D., Manrique, P., Conn, J. E., Moreno, M., Lescano, A. G., ... Vinetz, J. M. (2016). Epidemiology of Plasmodium vivax Malaria in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(6 Suppl), 133-144. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0268>
- Rosas-Aguirre, A., Speybroeck, N., Llanos-Cuentas, A., Rosanas-Urgell, A., Carrasco-Escobar, G., Rodriguez, H., ... Erhart, A. (2015). Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey. *PLoS ONE*, 10(9), e0137458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137458>
- Saah, A., & Hoover, D. (1997). «Sensitivity» and «Specificity» Reconsidered: The Meaning of These Terms in Analytical and Diagnostic Settings, 126(1), 91-94.

- Serra-Casas, E., Manrique, P., Ding, X. C., Carrasco-Escobar, G., Alava, F., Gave, A., ... Gamboa, D. (2017). Loop-mediated isothermal DNA amplification for asymptomatic malaria detection in challenging field settings: Technical performance and pilot implementation in the Peruvian Amazon. *PLOS ONE*, 12(10), e0185742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185742>
- Soto-Calle, V., Rosas-Aguirre, A., Llanos-Cuentas, A., Abatih, E., DeDeken, R., Rodriguez, H., ... Speybroeck, N. (2017). Spatio-temporal analysis of malaria incidence in the Peruvian Amazon Region between 2002 and 2013. *Scientific Reports*, 7. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1038/srep40350>
- Tanner, N., Zhang, Y., & Evans, T. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes, 58, 59-68.
- The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics. (2011). A Research Agenda for Malaria Eradication: Diagnoses and Diagnostics. *PLOS Medicine*, 8(1), e1000396. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000396>
- Wongsrichanalai, C., Barcus, M., Muth, S., Sutamihardja, A., & Wernsdorfer, W. (2007). A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT), 77(6), 119-127.
- Zhang, Y., Yao, Y., Du, W., Wu, K., Xu, W., Lin, M., ... Li, J. (2017). Development of loop-mediated isothermal amplification with *Plasmodium falciparum* unique genes for molecular diagnosis of human malaria. *Pathogens and Global Health*, 111(5), 247-255. <https://doi.org/10.1080/20477724.2017.1347379>
- Zhou, D., Guo, J., Xu, L., Gao, S., Lin, Q., Wu, Q., ... Que, Y. (2014). Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugarcane. *Scientific Reports*, 4, 4912. <https://doi.org/10.1038/srep04912>

Anexo 1. Alineamiento en MEGA 7 de *Pfr364* para *P. falciparum*.

1	9. Pf3D7_07_1494098_1495617/1-1520	TGGACACAAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTCGCAATACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
	10. Pf3D7_03_5890_7417/1-1528	TGGACACAAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTGGCCCTTACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
	11. Pf3D7_08_1411707_1413234/1-152	TGGACATTAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTCGCAATACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
	12. Pf3D7_04_1197013_1198325/1-131	TGGACACAAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTCGCAATACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
	13. Pf3D7_04_12625_14152/1-1528	TGGACATTAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTCGCAATACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
	14. Pf3D7_01_6829_8356/1-1528	TGGACACAAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTCGCAATACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
	15. Pf3D7_02_939061_940580/1-1520	TGGACACAAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTCGCAATACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
	16. Pf3D7_09_5423_6723/1-1301	TGGACACAAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTCGCAATACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
	17. Pf3D7_10_7167_8694/1-1528	TGGACATTAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTCGCAATACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
	18. Pf3D7_02_7496_9015/1-1520	TGGACACAAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTCGCAATACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
2	19. Pf3D7_12_2263886_2265413/1-152	TGGACACAAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTCGCAATACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
	20. Pf3D7_13_7053_8580/1-1528	TGGACATTAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTCGCAATACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
	21. Pf3D7_05_6515_8042/1-1528	TGGACATTAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTCGCAATACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
	22. Pf3D7_03_1052352_1053879/1-152	TGGACACAAAGTACAAAGTACCCCATTTTACTCGCAATACCGCTGCATTTTGGTCCCGGGGGTTTCTACGCT
	23. Pf3D7_08_6844_8371/1-1528	TCAAATTAATTCACGACTACTTCAATCAAAAGCTAATACGTGCTGCATTTAGGTGCAAGGACCTATTAAT
	24. Pf3D7_10_5788_6826/1-1039	TCAAATTAATTCACGACTACTTCAATCAAAAGCTAATACGTGCTGCATTTAGGTGCAAGGACCTATTAAT
	25. Pf3D7_13_5687_6711/1-1025	TCAAATTAATTCACGACTACTTCAATCAAAAGCTAATACGTGCTGCATTTAGGTGCAAGGACCTATTAAT
	26. Pf3D7_05_5149_6173/1-1025	TCAAATTAATTCACGACTACTTCAATCAAAAGCTAATACGTGCTGCATTTAGGTGCAAGGACCTATTAAT
	27. Pf3D7_09_4058_5072/1-1015	TCAAATTAATTCACGACTACTTCAATCAAAAGCTAATACGTGCTGCATTTAGGTGCAAGGACCTATTAAT
	28. Pf3D7_03_4524_5549/1-1026	TCAAATTAATTCACGACTACTTCAATCAAAAGCTAATACGTGCTGCATTTAGGTGCAAGGACCTATTAAT
	29. Pf3D7_04_11259_12284/1-1026	TCAAATTAATTCACGACTACTTCAATCAAAAGCTAATACGTGCTGCATTTAGGTGCAAGGACCTATTAAT
	30. Pf3D7_02_6131_7154/1-1024	TCAAATTAATTCACGACTACTTCAATCAAAAGCTAATACGTGCTGCATTTAGGTGCAAGGACCTATTAAT
	31. Pf3D7_11_5628_6660/1-1033	TCAAATTAATTCACGACTACTTCAATCAAAAGCTAATACGTGCTGCATTTAGGTGCAAGGACCTATTAAT
	32. Pf3D7_12_4957_5981/1-1025	TCAAATTAATTCACGACTACTTCAATCAAAAGCTAATACGTGCTGCATTTAGGTGCAAGGACCTATTAAT
	33. Pf3D7_01_5465_6488/1-1024	TCAAATTAATTCACGACTACTTCAATCAAAAGCTAATACGTGCTGCATTTAGGTGCAAGGACCTATTAAT
	34. Pf3D7_09_1535012_1536036/1-102	TCAAATTAATTCACGACTACTTCAATCAAAAGCTAATACGTGCTGCATTTAGGTGCAAGGACCTATTAAT
	35. Pf3D7_07_1495958_1496990/1-103	TCAAATTAATTCACGACTACTTCAATCAAAAGCTAATACGTGCTGCATTTAGGTGCAAGGACCTATTAAT

Donde,

1: Subfamilia 1, con un porcentaje de similitud entre las secuencias de 60.8%.

2: Subfamilia 2, con un porcentaje de similitud entre las secuencias de 34.49%.

Anexo 2. Alineamiento en MEGA 7 de *Pvr47* para *P. vivax*.

Species/Abbrev	Gr
1. AAKM01000398/1-268	
2. AAKM01002070/1-540	
3. AAKM01001579/1-363	
4. AAKM01000076/1-927	TGTGCTATATTTTTCGCTATATATATTTCTCATTTGTAACGAATTCATCTGATTTTCCGGTAAACATCTGTGAATATATTT
5. AAKM01000042/1-773	TGTGCTATATTTTTCGCTATATATATTTCTCATTTGTAACGAATTCATCTGATTTTCCGGTAAACATCTGTGAATATATTT
6. AAKM01000933/1-767	TGTGCTATATTTTTCGCTATATATATTTCTCATTTGTAACGAATTCATCTGATTTTCCGGTAAACATCTGTGAATATATTT
7. AAKM01000939/1-819	TGTGCTATATTTTTCGCTATATATATTTCTCATTTGTAACGAATTCATCTGATTTTCCGGTAAACATCTGTGAATATATTT
8. AAKM01000051/1-1054	TGTGCTATATTTTTCGCTATATATATTTCTCATTTGTAACGAATTCATCTGATTTTCCGGTAAACATCTGTGAATATATTT
9. AAKM01000578/1-898	TGTGCTATATTTTTCGCTATATATATTTCTCATTTGTAACGAATTCATCTGATTTTCCGGTAAACATCTGTGAATATATTT
10. AAKM01000055/1-105	TGTGCTATATTTTTCGCTATATATATTTCTCATTTGTAACGAATTCATCTGATTTTCCGGTAAACATCTGTGAATATATTT
11. AAKM01000040/1-105	TGTGCTATATTTTTCGCTATATATATTTCTCATTTGTAACGAATTCATCTGATTTTCCGGTAAACATCTGTGAATATATTT
12. AAKM01001428/1-692	TGTGCTATATTTTTCGCTATATATATTTCTCATTTGTAACGAATTCATCTGATTTTCCGGTAAACATCTGTGAATATATTT
13. AAKM01001816/1-782	TGTGCTATATTTTTCGCTATATATATTTCTCATTTGTAACGAATTCATCTGATTTTCCGGTAAACATCTGTGAATATATTT
14. AAKM01001890/1-465	TGTGCTATATTTTTCGCTATATATATTTCTCATTTGTAACGAATTCATCTGATTTTCCGGTAAACATCTGTGAATATATTT

Donde el porcentaje de similitud entre las 14 secuencias de *P. vivax* de 71.30%.

Anexo 3. Precipitación de productos de PCR.

Procedimiento:

1. Se transfirió la cantidad restante de producto de PCR a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL.
2. Se agregó un volumen de 1/10 de acetato de sodio 3 M pH 5.2.
3. Se agregó dos volúmenes y medio de etanol absoluto, y se homogenizó con el *vortex*.
4. Se incubó a -20°C por 60 minutos.
5. Al finalizar el tiempo de incubación, se centrifugó la muestra a 14 000 rpm por 15 minutos.
6. El sobrenadante fue descartado y se dejó secar el tubo brevemente de cabeza sobre un papel toalla.
7. Se agregó 300 µL de etanol al 70% y se homogenizó con el *vortex*.
8. Se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos.
9. El sobrenadante fue descartado y se dejó secar el tubo brevemente de cabeza sobre un papel toalla por 15 minutos.
10. Se colocó el tubo por 15 minutos en el termobloque a 60°C para eliminar restos de etanol.
11. Se agregó 15 µL de agua de PCR y se dejó resuspender por 15 minutos.
12. Se homogenizó con el *vortex*, se hizo un short spin y se corrieron 3 µL en un gel de agarosa al 2%.
13. Se conservó a -20°C para su posterior uso.

Anexo 4. Transformación de células químicamente competentes.

Procedimiento:

1. Se prepararon todos los materiales e instrumentos a utilizar: medio S.O.C. a temperatura ambiente y baño maría a 42°C.
2. Se colocaron dos viales con las células en hielo.
3. Se pipeteó 5 µL de ligado de producto de *P. falciparum* y se agregó al vial de células. Se hizo lo mismo con el ligado del producto de *P. vivax*.
4. Se incubaron ambos viales en hielo por 30 minutos.
5. Luego del tiempo de incubación, se sometieron los viales a un choque térmico al colocarlos por 2 minutos a 42°C en el baño maría.
6. Inmediatamente se colocaron los tubos a hielo de nuevo y se agregó 250 µL de medio S.O.C. a cada vial.
7. Se incubaron ambos viales a 37°C en un *Thermo Mixer Eppendorf* por una hora.

Al cabo de 60 minutos, se sembró el contenido del tubo en placas con Agar LB y ampicilina (100 mg/mL).

Se agregó directamente a la placa 80 µL de X-gal 2%, 5 µL de IPTG 20% y 100 µL de células transformadas; se rastrilló con un asa de Digraslky hasta que la placa secó por completo. Se sembró una placa para cada especie.

Se colocó en la incubadora por 20 horas a 37°C y se observó el crecimiento de colonias blancas y colonias azules al concluir el tiempo.

Anexo 5. *Minipreparation* del plásmido.

Procedimiento:

1. Se centrifugaron los tubos a 13 000 rpm por 2 minutos para obtener un *pellet*. Se descartó el sobrenadante.
2. Se resuspendió el *pellet* en 100 μ L de Solución Alcalina I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) y se colocó en hielo.
3. Se agregó 200 μ L de Solución Alcalina II y se homogenizó por inversión 5 – 6 veces, se incubó en hielo por 5 minutos.
4. Se añadió 150 μ L de Solución Alcalina III (Acetato de Sodio 3 M pH 5.2) y se homogenizó por inversión 5 – 6 veces. Se incubó en hielo por 5 minutos.
5. Se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos.
6. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf 1.5 mL y se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto (aproximadamente 900 μ L).
7. Se incubó por 60 minutos a -20°C.
8. Se centrifugó a 13 000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante fue descartado. Se dejó secar el tubo abierto invertido sobre un papel toalla por unos minutos.
9. Se agregó 1 mL de etanol al 70% e incubó en hielo por 5 minutos.
10. Se centrifugó a 13 000 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar en papel toalla.
11. Se colocaron los tubos abiertos en el termobloque a 60°C para eliminar residuos de etanol.
12. Se agregó 100 μ L de *buffer* de elución.

Anexo 6. *Midipreparation* del plásmido.

Procedimiento:

1. Se centrifugó el *falcon* con 15 mL de cultivo por 10 minutos a 3000 x g. Se descartó el sobrenadante.
2. Se resuspendió el *pellet* en 1 mL de *Buffer* TE (Solución Alcalina I).
3. Se añadió 1 mL de *Lysis Solution*. Se mezcló por inversión de 5 a 6 veces observando que la solución se vuelve viscosa y se aclara. Se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente.
4. Se agregó 1 mL de *Neutralization Solution* y se mezcló por inversión de 5 a 8 veces.
5. Se añadió 0.25 mL de *Endotoxin Binding Reagent* y se mezcló por inversión de 5 a 8 veces. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente observando la formación de un precipitado blanco.
6. Se añadió 1.5 mL de etanol absoluto y se mezcló por inversión de 5 a 6 veces.
7. Se centrifugó por 30 minutos a 3000 xg para *pelletear* el debris celular y ADN cromosómico.
8. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 15 mL nuevo sin tocar el precipitado blanco.
9. Se añadió 1.5 mL de etanol absoluto y se mezcló por inversión de 5 a 6 veces.
10. La solución fue transferida a la columna y se centrifugó por 3 minutos a 2000 x g. Se descartó el filtrado y la columna se colocó en un nuevo tubo colector.
11. Se añadió 2 mL de *Wash Solution I* a la columna y se centrifugó por 2 minutos a 3000 x g. Se descartó el filtrado y la columna se colocó en un nuevo tubo colector.
12. Se añadió 2 mL de *Wash Solution II* a la columna y se centrifugó por 2 minutos a 3000 x g. Se descartó el filtrado y la columna se colocó en un nuevo tubo colector.
13. Se repitió el lavado con *Wash Solution II*.
14. Para remover los residuos de etanol que puedan haber quedado, se centrifugó por 5 minutos a 3000 x g. Se descartó el filtrado y la columna se colocó en un nuevo tubo colector.
15. Se añadió 300 µL de *Elution Buffer* en el centro de la columna y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó por 5 minutos a 3000 x g para eluir el ADN plasmídico.
16. Se descartó la columna y se transfirió el filtrado a un tubo de 1.5 mL. Se guardó el ADN plasmídico a 4°C.

Anexo 7. Determinación teórica del número de copias en una concentración conocida de ADN plasmídico.

Para saber el número de copias teóricas en un stock de concentración conocida de plásmido, primero se halló el peso del plásmido con la siguiente fórmula:

$$\text{Peso del plásmido (gramos)} = \frac{(Tv + Ti) \times 660}{6.023 \times 10^{23}}$$

Donde,

Tv = Tamaño del vector plasmídico en pares de bases. Para el utilizado en este trabajo el valor es de 3929 pb.

Ti = Tamaño del inserto en pares de bases. Para *Pfr364* el tamaño del inserto es de 272 pb y para *Pvr47* es de 211 pb.

Luego, se convierte el peso obtenido en gramos a nanogramos y se calcula el número de copias dividiendo la concentración del stock (ng/μL) sobre el peso del plásmido correspondiente para cada *target* (ng).

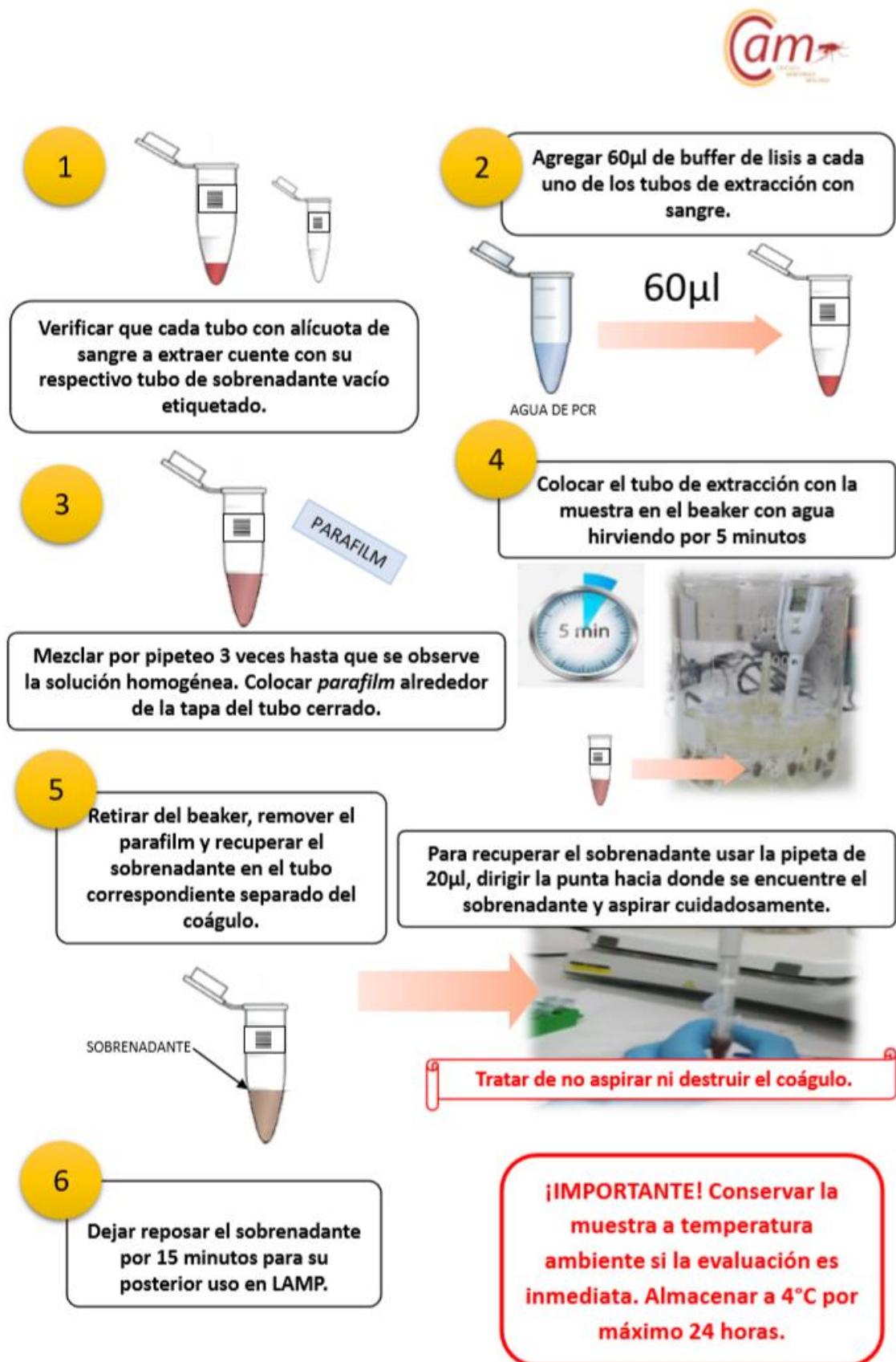
Siendo para *Pfr364*,

$$\text{Número de copias } Pfr364 = \frac{1.72 \text{ ng}/\mu\text{L}}{4.60345E - 09} = 373,632,818.86 \text{ copias}/\mu\text{L}$$

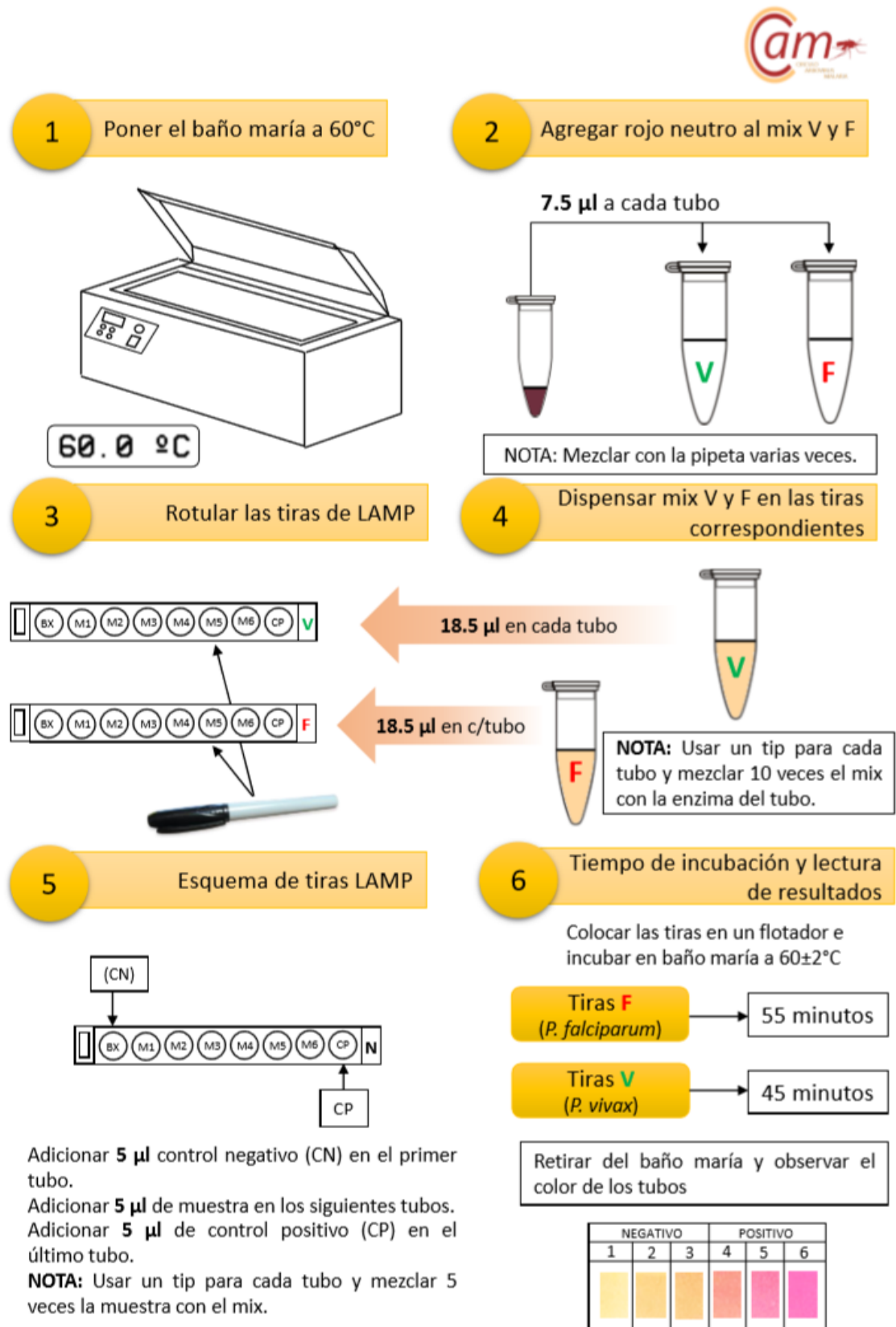
Y para *Pvr47*,

$$\text{Número de copias } Pvr47 = \frac{1.94 \text{ ng}/\mu\text{L}}{4.53661E - 09} = 427,632,086.51 \text{ copias}/\mu\text{L}$$

Anexo 8. Flujograma de la extracción “Boil & Spin”.



Anexo 9. Flujoograma de la reacción de LAMP en un formato simplificado.



Anexo 10. Aprobación del Comité de Ética de UPCH.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
Vicerrectorado de Investigación
Dirección Universitaria de Investigación,
Ciencia y Tecnología (DUICT)

CONSTANCIA 027 - 03 - 17

El Miembro del Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética, bajo la categoría de revisión **EXPEDITA**. La aprobación será ratificada en la sesión del comité más próxima a la fecha de emisión de este documento.

Título del Proyecto : "Elaboración de una plataforma de diagnóstico molecular diferencial para zika, dengue, chikungunya y malaria".

Código de inscripción : 100405

Investigador principal : Nolasco Cárdenas, Oscar Patricio

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. Protocolo de investigación, versión recibida el 11 de enero del 2017.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **19 de enero del 2018**.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 20 de enero del 2017.

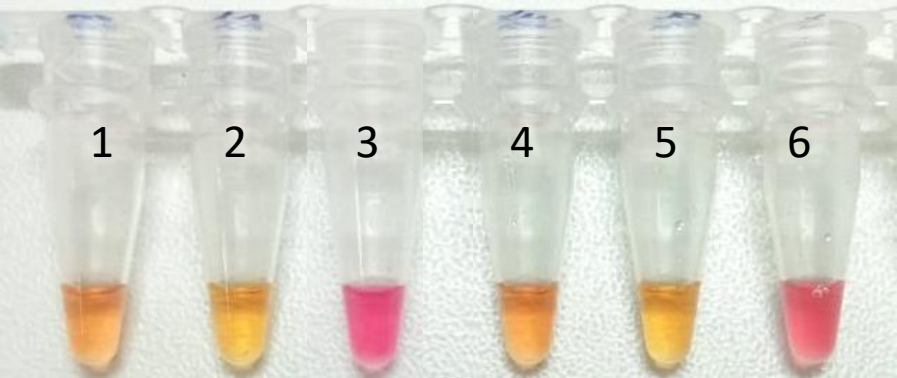

Dra. Inés Bustamante Chávez
Presidenta (i)
Comité Institucional de Ética en Investigación



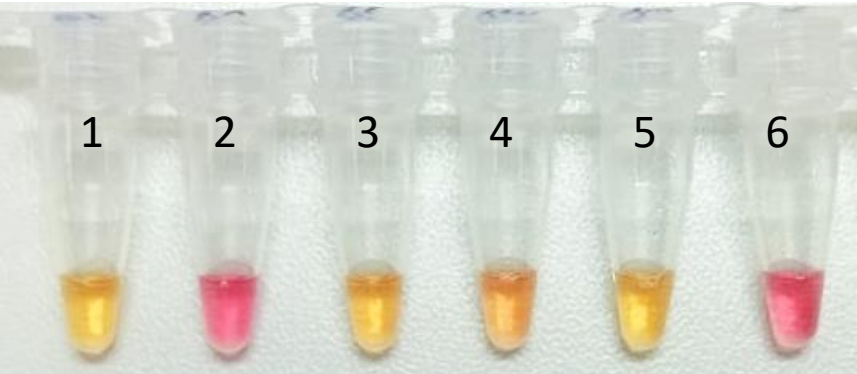
/go

Anexo 11. Ensayo de especificidad analítica para el sistema LAMP de *P. falciparum* y *P. vivax*.

Especificidad analítica de los cebadores para *P. falciparum*.



Especificidad analítica de los cebadores para *P. vivax*.

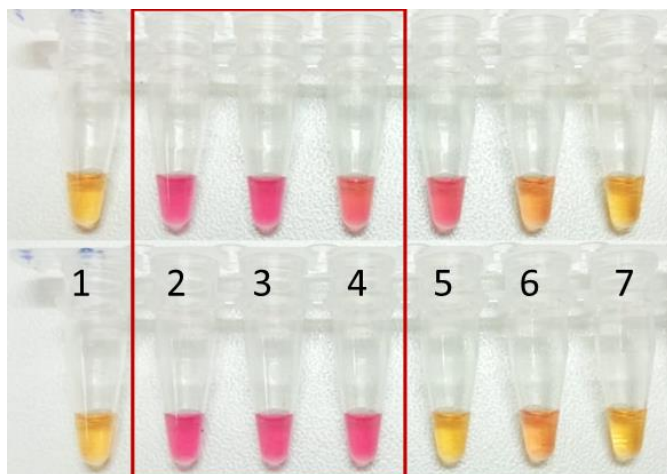


Donde,

Tubo	1	2	3	4	5	6
Target	Bx	<i>P. vivax</i> Sal I	<i>P. falcip.</i> 3D7	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	CP
<i>Pfr364</i>	-	-	+	-	-	+
<i>Pvr47</i>	-	+	-	-	-	+

Anexo 12. Ensayo de sensibilidad analítica para el sistema LAMP de *P. falciparum* y *P. vivax*.

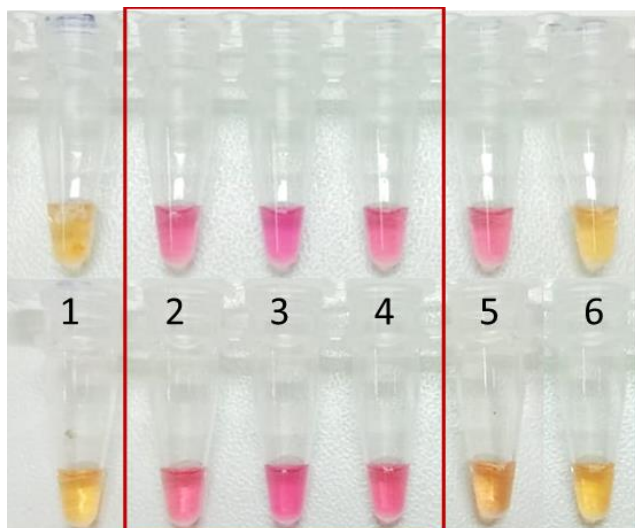
Límite de detección para los cebadores de Pfr364:



Donde,

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Parásitos equivalentes/ μ L	Bx	1869.5	186.9	18.70	9.35	1.87	0.19

Límite de detección para los cebadores de Pvr47:



Donde,

Tubo	1	2	3	4	5	6
Parásitos equivalentes/ μ L	Bx	389.3	38.93	3.89	1.95	0.39

Anexo 13. Resultados de todas las muestras qPCR positivas.

ID	Microscopía	LAMP Pfr364	LAMP Pvr47	qPCR	Parásitos/μl
1	-	-	+	<i>P. vivax</i>	8587.46
2	+	-	+	<i>P. vivax</i>	6332.01
3	+	-	+	<i>P. vivax</i>	1770.37
4	+	-	+	<i>P. vivax</i>	1723.39
5	+	+	+	<i>P. vivax</i>	1058.61
6	+	+	-	<i>P. falciparum</i>	859.65
7	-	-	-	<i>P. vivax</i>	306.89
8	+	+	+	<i>P. vivax</i>	257.94
9	+	-	+	<i>P. vivax</i>	221.62
10	+	+	-	<i>P. falciparum</i>	197.98
11	+	-	+	<i>P. vivax</i>	188.96
12	-	-	+	<i>P. vivax</i>	14.63
13	-	-	-	<i>P. falciparum</i>	10.43
14	-	+	+	<i>P. vivax</i>	6.97
15	-	-	+	<i>P. vivax</i>	6.31
16	-	-	-	<i>P. vivax</i>	4.03
17	-	+	-	<i>P. falciparum</i>	4.03
18	-	-	-	<i>P. vivax</i>	2.19
19	-	-	+	<i>P. vivax</i>	2.11
20	-	-	-	<i>P. falciparum</i>	1.29
21	-	-	-	<i>P. falciparum</i>	0.98
22	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.68
23	-	+	+	<i>P. vivax</i>	0.50
24	-	-	+	<i>P. vivax</i>	0.33
25	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.33
26	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.24
27	-	+	-	<i>P. falciparum</i>	0.18
28	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.12
29	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.10
30	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.08
31	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.07
32	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.07
33	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.05
34	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.04
35	-	-	-	<i>P. falciparum</i>	0.04
36	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.04
37	-	-	-	<i>P. falciparum</i>	0.03
38	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.03
39	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.03
40	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.03
41	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.02
42	-	-	-	<i>P. vivax</i>	0.01